



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LEIDE CAROLINE DOS SANTOS PICANÇO**

---

**Planejamento de candidatos a fármacos multialvo inibidores de  
acetilcolinesterase (AChE) e glicogênio sintase quinase-3 $\beta$   
(GSK-3 $\beta$ ) para tratamento da doença de Alzheimer**

---

**Macapá**  
**2018**

**LEIDE CAROLINE DOS SANTOS PICAÑO**

---

**Planejamento de candidatos a fármacos multialvo inibidores de acetilcolinesterase (AChE) e glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) para tratamento da doença de Alzheimer**

---

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorane Izabel da Silva Hage Melim

**Macapá  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá  
Bibliotecária Orinete Costa Souza CRB-11/920

616.831

P585e Picanço, Leide Caroline dos Santos.

**1.1.1.** *Planejamento de candidatos a fármacos multialvo inibidores de Acetilcolinesterase (AChE) e glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) para tratamento da doença de Alzheimer / Leide Caroline dos Santos Picanço; orientadora, Lorane Izabel da Silva Hage Melim. – Macapá, 2018.*

100 f.

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

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal do Amapá**

**BANCA EXAMINADORA**

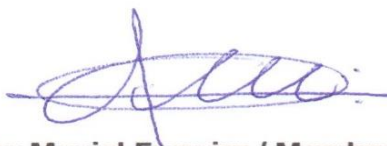
**Aluno (a): Leide Caroline dos Santos Picanço**

---

**Orientador (a): Profª. Drª. Lorane Izabel da Silva Hage Melim**

  
**Drª. Lorane Izabel da Silva Hage Melim / Presidente**

Professora Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



**Dr. Irlon Maciel Ferreira / Membro Titular**

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

  
**Drª. Gisele da Silva Botas Cruz / Membro Suplente**

Professora do Curso de Farmácia do Instituto Macapaense de Ensino Superior, IMMES.

**Data:** 07/03/2018

***À minha família, em especial aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram em meus estudos.***

## AGRADECIMENTOS

---

*A Deus por iluminar meu caminho e sempre me guiar nas escolhas certas.*

*Aos meus pais, Alcidiney Penha Picanço e Leda Maria Costa dos Santos Picanço, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão.*

*Aos meus avôs, Rufino Dias dos Santos e Joaquina Costa dos Santos, pelo amor e incentivo.*

*Aos meus irmãos, Liliâne dos Santos Picanço e Alcides dos Santos Picanço, por me apoiarem e estarem ao meu lado nos momentos que precisei.*

*Ao meu amor, melhor amigo, companheiro, confidente e namorado, Arão de Souza Lopes, pelos conselhos, incentivo e por estar ao meu lado, principalmente, durante o final do meu mestrado.*

*À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorane Izabel da Silva Hage Melim pelo incentivo a pesquisa e ensinamentos, pela compreensão, paciência e dedicação.*

*Aos colegas de Laboratório de Química Medicinal e Farmacêutica (PharMedChem) /UNIFAP pela ajuda e apoio.*

*Ao laboratório de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica/UNIFAP, em especial ao prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira, pela orientação e apoio.*

*A todos os colegas da turma de mestrado 2016 e professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo convívio e aprendizado.*

*“Não sou aquele que sabe, mas aquele que busca”  
(Hermann Hesse)*

*” Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz com aquilo  
que você sabe”.  
(Aldous Huxley)*

*“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência”  
(Edgar Allan Poe)*

*“Um homem não tem que fazer tudo, mas algo, e não é porque não pode  
fazer tudo que precisa fazer este algo de maneira errada”  
(Henry David Thoreau)*

|          |                                                                                                                              |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                       | <b>1</b>  |
| 1.1      | DOENÇA DE ALZHEIMER.....                                                                                                     | 1         |
| 1.2      | FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....                                                                                   | 2         |
| 1.2.1    | Hipótese Colinérgica.....                                                                                                    | 2         |
| 1.2.2    | Hipótese Amiloidogênica.....                                                                                                 | 2         |
| 1.2.3    | Hiperfosforilação da Proteína Tau.....                                                                                       | 4         |
| 1.3      | ENFOQUES TERAPÊUTICOS.....                                                                                                   | 5         |
| 1.3.1    | Inibidores da Acetilcolinesterase (IAChE).....                                                                               | 5         |
| 1.3.2    | Inibidores da beta-secretase (BACE-1).....                                                                                   | 7         |
| 1.3.3    | Inibidores da Glicogênio sintase quinase-3-beta (IGSK-3 $\beta$ ).....                                                       | 8         |
| 1.4      | PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS.....                                                                                                | 9         |
| 1.5      | FÁRMACOS MULTIALVO.....                                                                                                      | 11        |
| 1.6      | DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTI-ALZHEIMER.....                                                             | 13        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                        | <b>19</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL.....                                                                                                          | 19        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                                   | 19        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                              | <b>20</b> |
| 3.1      | MODELAGEM MOLECULAR DOS DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS SELECIONADOS .....                                                    | 20        |
| 3.2      | ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR USANDO O PROGRAMA GOLD 4.1 .....                                                                 | 20        |
| 3.3      | PREDIÇÃO DO PADRÃO FARMACOFÓRICO .....                                                                                       | 21        |
| 3.4      | PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS (ADME) E TOXICOLÓGICA (TOX) DOS DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS SELECIONADOS ..... | 22        |
| 3.5      | PLANEJAMENTO DE PROTÓTIPO HÍBRIDO .....                                                                                      | 23        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                                                                                          | <b>24</b> |
| 4.1      | DOCKING MOLECULAR.....                                                                                                       | 24        |
| 4.2      | PREDIÇÃO DO PADRÃO FARMACOFÓRICO.....                                                                                        | 38        |
| 4.3      | PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS (ADME) E TOXICOLÓGICAS (TOX).....                                                 | 40        |

|     |                                                                                               |    |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4 | MODIFICAÇÕES REALIZADAS.....                                                                  | 45 |
| 4.5 | ESTUDO DE PREDIÇÃO DE ATIVIDADE DAS PROPOSTAS.....                                            | 47 |
| 4.6 | PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS (ADME) E<br>TOXICOLÓGICAS (TOX) DAS PROPOSTAS..... | 51 |
| 4.7 | <i>DOCKING</i> MOLECULAR DAS PROPOSTAS.....                                                   | 54 |
| 5   | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>                                               | 62 |
|     | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                      | 63 |

## LISTA DE TABELAS

---

|                    |                                                                                                         |    |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1 -</b>  | Descrição dos derivados de Produtos Naturais com atividade anti-Alzheimer.....                          | 14 |
| <b>Tabela 2 -</b>  | Análise dos resultados de <i>Docking</i> Molecular gerada pelo programa Gold – AChE.....                | 33 |
| <b>Tabela 3 -</b>  | Análise dos resultados de <i>Docking</i> Molecular gerada pelo programa Gold – GSK-3 $\beta$ .....      | 36 |
| <b>Tabela 4 -</b>  | Propriedades de absorção dos derivados de produtos naturais.....                                        | 41 |
| <b>Tabela 5 -</b>  | Propriedade de penetração na BHE e área de superfície polar para os derivados de produtos naturais..... | 42 |
| <b>Tabela 6 -</b>  | Análise das propriedades toxicológicas dos produtos natura.....                                         | 43 |
| <b>Tabela 7 -</b>  | Predição da atividade biológica dos derivados de produtos naturais.....                                 | 50 |
| <b>Tabela 8 -</b>  | Propriedades de absorção das propostas.....                                                             | 52 |
| <b>Tabela 9 -</b>  | Propriedade de penetração na BHE e área de superfície polar para as propostas.....                      | 52 |
| <b>Tabela 10 -</b> | Análise das propriedades toxicológicas das propostas.....                                               | 53 |
| <b>Tabela 11-</b>  | Análise dos resultados de <i>Docking</i> Molecular das propostas gerada pelo programa Gold – AChE.....  | 58 |
| <b>Tabela 12 -</b> | Análise dos resultados de <i>Docking</i> Molecular das propostas gerada pelo programa Gold – AChE.....  | 60 |

## LISTA DE FIGURAS

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1 -</b> | Processo de agregação do peptídeo $\beta$ A.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 3  |
| <b>Figura 2 -</b> | Processo de formação dos emaranhados neurofibrilares .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 4  |
| <b>Figura 3 -</b> | Fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento de DA. (a) tacrina, (b) galantamina, (c) rivastigmina, (d) donepezil e memantina (e).....                                                                                                                                                                                                                      | 6  |
| <b>Figura 4 -</b> | Inibidores da GSK-3 $\beta$ . (a) Alsterpaullona, (b) 6-metil-N-[3- [[3- (1-metiletil) propil] carbamoil] -1H-pirazol- 4-il] piridina-3-carboxamida, (c) AR-A01441811 e (d) SB-21676310.....                                                                                                                                                                 | 9  |
| <b>Figura 5 -</b> | Estrutura dos derivados de produtos naturais selecionados da literatura.....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 25 |
| <b>Figura 6 -</b> | (a) Reprodução da orientação cristalográfica (ligante experimental) (verde) no sítio de ligação GSK-3 $\beta$ e conformação com a maior escore do ligante após o Docking (azul). (b) Reprodução da orientação cristalográfica (ligante experimental) (verde) no sítio de ligação AChE e conformação com a maior escore do ligante após o Docking (azul)..... | 26 |
| <b>Figura 7 -</b> | Resultado do <i>docking</i> dos derivados de produtos naturais e suas interações com o sítio de ligação da AChE: Ligação de hidrogênio convencional (verde), ligação de hidrogênio não convencional (azul) e interação hidrofóbica (rosa).....                                                                                                               | 29 |
| <b>Figura 8 -</b> | Resultado do <i>docking</i> dos derivados de produtos naturais e suas interações com o sítio de ligação da GSK-3 $\beta$ : Ligação de hidrogênio convencional (verde), ligação de hidrogênio não convencional (azul) e interação hidrofóbica (rosa).....                                                                                                     | 31 |
| <b>Figura 9 -</b> | Alinhamento e modelo farmacofórico gerado para os derivados de                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| produtos naturais com o servidor PharmaGist.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 39 |
| <b>Figura 10 -</b> Modificações realizadas na Fisostigmina para a preparação dos candidatos a fármacos anticolinesterásicos.....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 46 |
| <b>Figura 11 -</b> Modificações realizadas na Fisostigmina e na Luteolina para a preparação dos híbridos candidatos à fármacos multialvo para a AChE e GSK-3 $\beta$ .....                                                                                                                                                                                                                               | 47 |
| <b>Figura 12 -</b> Propostas candidatas a fármacos anticolinesterásicos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 48 |
| <b>Figura 13 -</b> Propostas híbridas candidatas à fármacos multialvo para a AChE e GSK-3 $\beta$ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 49 |
| <b>Figura 14 -</b> Resultado do <i>docking</i> das propostas realizadas e suas interações com o sítio de ligação da AChE: Ligação de hidrogênio convencional (verde), ligação de hidrogênio não convencional (azul) e interação hidrofóbica (rosa). a) Proposta 1; b) Proposta 2; c) Proposta 3; d) Proposta 4; e) Proposta 5; f) Proposta 6; g) Proposta 7; h) Proposta 8; i) Proposta 9.....           | 56 |
| <b>Figura 15 -</b> Resultado do <i>docking</i> das propostas realizadas e suas interações com o sítio de ligação da GSK-3 $\beta$ : Ligação de hidrogênio convencional (verde), ligação de hidrogênio não convencional (azul) e interação hidrofóbica (rosa). a) Proposta 1; b) Proposta 2; c) Proposta 3; d) Proposta 4; e) Proposta 5; f) Proposta 6; g) Proposta 7; h) Proposta 8; i) Proposta 9..... | 57 |

|                |                                                                     |
|----------------|---------------------------------------------------------------------|
| ACh            | Acetilcolina                                                        |
| AChE           | Acetilcolinesterase                                                 |
| ADME/Tox       | Absorção/Distribuição/Metabolismo/Excreção/Toxicológica             |
| APP            | Proteína precursora do peptídeo $\beta$ -amiloide                   |
| ApoE           | Apolipoproteína E                                                   |
| ATP            | Adenosina tri-fosfato                                               |
| $\beta$ A      | Beta-amiloide                                                       |
| BACE-1         | Beta-secretase                                                      |
| BChE           | Butilcolinesterase                                                  |
| BHE            | Barreira Hematoencefálica                                           |
| Caco-2         | Human Colon Carcinoma Cell Line                                     |
| CAT            | Colina acetiltransferase                                            |
| CAS            | Sítio catalítico                                                    |
| CCL            | Comprometimento Cognitivo Leve                                      |
| CDK2           | Cinase dependente de ciclina 2                                      |
| DA             | Doença de Alzheimer                                                 |
| FDA            | Food and Drug Administration                                        |
| FPsa           | Fast Polar Surface área                                             |
| GA             | Algoritmo genético                                                  |
| GOLD           | Genetic Optimisation for Ligand <i>Docking</i>                      |
| GSK-3          | Glicogênio sintase quinase-3                                        |
| hERG           | Ether-a-go-go                                                       |
| IACHe          | Inibidores de acetilcolinesterase                                   |
| IGSK-3 $\beta$ | Inibidores de glicogênio sintase quinase-3 $\beta$                  |
| IL-1           | Interleucina-1                                                      |
| LBDD           | Ligand-Based Drug Design (Fármacos baseado na estrutura do ligante) |
| LDL            | Low Density Lipoproteins                                            |
| LogBB          | Coeficiente de partição cérebro/sangue                              |
| LogP           | Coeficiente de partição                                             |
| KHG21834       | 2-(3-(benzo[d]tiazol-2-il)ureido)acetato                            |

|                |                                                                                                                    |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| logP           | Coeficiente de lipofilicidade                                                                                      |
| PAM            | Proteína associada ao microtúbulo                                                                                  |
| PDB            | Protein Data Bank                                                                                                  |
| MAO-A          | Monoamino oxidase-A                                                                                                |
| MAO-B          | Monoamino oxidase-A                                                                                                |
| MDCK           | Madin-Darby Canine Kidney                                                                                          |
| mL             | Mililitro                                                                                                          |
| mM             | Milimolar                                                                                                          |
| MMP            | Pares moleculares correspondentes                                                                                  |
| NADPH          | Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina                                                                  |
| NF- $\kappa$ B | Fator nuclear de transcrição $\kappa$ B                                                                            |
| NrF2           | Fator eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2                                                                   |
| nm             | Nanômetro                                                                                                          |
| nM             | Nanomolar                                                                                                          |
| NMDA           | N-metil-D-aspartato                                                                                                |
| PAS            | Sítio aniônico periférico                                                                                          |
| PASS           | Prediction of Activity Spectra for Substances (predição <i>in silico</i> de espectros de atividade de substâncias) |
| PDB            | Protein Data Bank                                                                                                  |
| PPI            | Prepulse inhibition of the startle (Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto)                              |
| PSA            | Área de superfície polar                                                                                           |
| QSAR           | Relação estrutura-atividade quantitativa                                                                           |
| REA            | Relação estrutura atividade                                                                                        |
| ROS            | Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)                                                            |
| SBDD           | Structure-Based Drug Design (Fármacos baseado na estrutura do receptor)                                            |
| SNC            | Sistema Nervoso Central                                                                                            |
| TAC-SAC-BTA    | Tacrina-S-alilcisteína-benzotiazol                                                                                 |
| TNF            | Fator de Necrose Tumoral                                                                                           |
| TPSA           | Total Polar Surface Area                                                                                           |
| TSA            | Área total da superfície                                                                                           |
| $\mu$ L        | Microlitros                                                                                                        |

## Planejamento de candidatos a fármacos multialvo inibidores de acetilcolinesterase (ACHE) e glicogênio sintase quinase-3 $\beta$ (GSK-3B) para tratamento da doença de Alzheimer

### RESUMO

**Introdução:** A Doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pelo aparecimento de placas senis e emaranhados neurofibrilares. Como tratamento, utilizam-se inibidores da acetilcolinesterase (IACHÉ) e a memantina, entretanto, buscam-se outras alternativas terapêuticas, como os inibidores da Glicogênio Sintase Quinase-3 $\beta$  (IGSK-3 $\beta$ ). Todavia, fármacos direcionado a um único alvo nem sempre podem modificar sistemas complexos, os quais possuem diversos mecanismos patológicos. **Objetivo:** Portanto, o objetivo desta pesquisa foi planejar novos candidatos a fármacos multialvo IACHÉ-IGSK-3 $\beta$  para tratamento da DA. **Metodologia:** Inicialmente, selecionaram-se 13 compostos com atividade anti-Alzheimer comprovada. Realizou-se a simulação de *docking* no programa GOLD. Subsequentemente, foi feita a derivação do padrão farmacofórico no webserver PharmaGist. As propriedades farmacocinéticas foram computadas no módulo QikProp do software Schrödinger e o perfil de toxicidade foi avaliado usando o programa DEREK. Por fim, foi feita a hibridação molecular entre as subunidades estruturais de um IACHÉ e um IGSK-3 $\beta$ . **Resultados e discussões:** No estudo de docking, foram observadas interações de hidrogênios e hidrofóbicas entre as enzimas, AChE e GSK-3 $\beta$ , e os compostos selecionados. Na derivação do grupo farmacofórico, foram alinhadas 8 moléculas com 3 pontos farmacofóricos: uma região aromática e duas regiões aceptoras de hidrogênio. Os inibidores apresentaram bons resultados na predição farmacocinética e toxicológica. Posteriormente, a Fisostigmina e a Luteolina foram escolhidas como protótipos para o planejamento de novos candidatos a fármacos IACHÉ e IGSK-3 $\beta$ . Elaboraram-se 9 propostas, 5 IACHÉs e 4 híbridos IACHÉ-IGSK-3 $\beta$ . Na predição da atividade biológica, as 9 propostas exibiram atividade anti-Alzheimer. Além disso, os resultados mostraram que as propostas 1, 2 e 5, obtiveram os melhores resultados nas predições farmacocinéticas e toxicológicas, entretanto, os híbridos 6, 7, 8 e 9 apresentaram maior afinidade pelas enzimas AChE e GSK-3 $\beta$ . **Conclusões:** Portanto, as propostas 1 e 2 e os híbridos 6 e 8 foram escolhidos como potentes candidatos a fármacos IACHÉ e IACHÉ-IGSK-3 $\beta$ .

**Palavras-Chave:** Doença de Alzheimer; Fármacos Multialvos; Acetilcolinesterase; Glicogênio Sintase Quinase-3 $\beta$ .

**DESIGN OF MULTI-TARGET DIRECTED DRUGS FOR ALZHEIMER'S DISEASE  
TREATMENT: DUAL INHIBITORS AGAINST ACETYLCHOLINESTERASE (AChE)  
AND GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3B (GSK-3 $\beta$ )**

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) is characterized by appearance of senile plaques and neurofibrillary tangles. Acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) and memantine are used as treatment, however, other therapeutic alternatives for AD treatment has been searched, such as Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  inhibitors (GSK-3 $\beta$ I). Although, one-target drugs can not always modify complex systems, which has several pathological mechanisms. **Objectives:** Therefore, the aim of this research was to design new AChEI-GSK-3 $\beta$ I multi-target drug candidates for AD treatment. **Methodology:** Initially, 13 compounds with proven anti-Alzheimer activity were selected. Molecular docking was performed using the GOLD program. Subsequently, pharmacophoric modeling was derived from the PharmaGist webserver. Pharmacokinetic properties were computed using QikProp module of Schrödinger and toxicity profile was evaluated using the DEREK program. Finally, molecular hybridization was performed between the structural subunits of AChEI and GSK-3 $\beta$ I. **Results and discussion:** In docking study, hydrogen and hydrophobic interactions between AChE and GSK-3 $\beta$  enzymes and selected compounds were observed. In derivation of pharmacophore group, 8 molecules with 3 pharmacophoric points were aligned: one aromatic rings and two hydrogen bond acceptors. Inhibitors demonstrated good pharmacokinetic and toxicological prediction results. After, Physostigmine and Luteolin were chosen as prototypes for design of new AChEI and GSK-3 $\beta$ I drugs candidates. 9 proposals, 5 AChEIs and 4 hybrids AChEI-GSK-3 $\beta$  were designed. In prediction of biological activity, 9 proposals exhibited anti-Alzheimer activity. In addition, results showed that proposals 1, 2 and 5 obtained the best results in pharmacokinetic and toxicological predictions, still hybrids 6, 7, 8 and 9 presented higher affinity for both AChE and GSK-3 $\beta$  enzymes. **Conclusions:** Therefore, proposals 1 and 2 and Hybrids 6 and 8 were chosen as potent AChEI and AChEI-GSK-3 $\beta$ I drugs candidates.

**Keywords:** *Alzheimer's disease; Multi-Target Drugs; Acetylcholinesterase; Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ .*

## 1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa na qual ocorre a morte neuronal devido a alterações fisiológicas e morfológicas, afetando, principalmente, a população com idade entre 65 a 90 anos. Em 2013, foram estimados cerca de 44,4 milhões de casos no mundo e, em 2030, estima-se um aumento para aproximadamente 75,6 milhões de casos. O acúmulo da proteína  $\beta$ -amiloide e da proteína Tau são as principais causas da progressão DA e aparecimento de sintomas, tal como a perda progressiva da memória, depressão, dificuldade na fala, desorientação, alterações do humor e do sono, entre outros (NEWMAN et al., 2011; NERY, 2015). As características histopatológicas da DA são a presença extracelular dos peptídeos  $\beta$ A, dos emaranhados neurofibrilares no meio intracelular, redução e disfunção das sinapses, morte neuronal e redução do volume cerebral (MATTSON, 2004; ZUSSY et al., 2013).

A proteína Tau, presente nos microtúbulos das células nervosas, quando hiperfosforilada é responsável pela formação e acúmulo dos emaranhados neurofibrilares que, posteriormente, causa a morte neuronal. A proteína precursora do peptídeo amiloide (APP) é clivada pelas enzimas  $\beta$ -secretase (via amiloidogênica),  $\alpha$ -secretase (via não amiloidogênica) e  $\gamma$ -secretase (que catalisa os produtos das duas vias), sendo a primeira via, responsável pela produção dos peptídeos mais tóxicos para os neurônios,  $A\beta$  1-42 (SONKUSARE et al., 2005; PÁKÁSKI; KÁLMÁN, 2008; SWAROWSKY, 2009; BERG et al., 2012; SEMIGHINI, 2013).

Outros fatores responsáveis pela perda progressiva da cognição na DA são: a diminuição da neurotransmissão colinérgica ocasionada pela redução da atividade da colina acetiltransferase, o estresse oxidativo, causado por radicais livres e que provoca danos no tecido neuronal e a neuroinflamação decorrente de processos celulares e neuroquímicos, no qual há elevação dos níveis de interleucinas e diminuição dos níveis do fator de necrose tumoral-alfa (MULLAN, 2000; BONDA et al., 2010; EASTON et al., 2013; LU et al., 2013; RICHARDSON et al., 2013).

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

### 1.2.1 Hipótese colinérgica

Um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DA é a diminuição da inervação colinérgica que começa na região do proencéfalo basal, no Núcleo Basal de Meynert. Na Demência Prodrômica ou Comprometimento Cognitivo Leve (CCL), há um aumento de emaranhados neurofibrilares nos neurônios dessa região e que está relacionado ao desempenho de pacientes nos testes de memória. Esse déficit da neurotransmissão colinérgica também é observado na DA. Além disso, estudos relatam que a redução da atividade da acetilcolina transferase (CAT) está associada ao aumento dos níveis de peptídeo  $\beta$ A (SCHLIEBS; ARENDT, 2011; POTTER et al., 2012; MESULAM, 2013; HAMPEL et al., 2017).

Há uma perda de receptores nicotínicos do subtipo  $\alpha 7$  na DA observado em Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons e esses receptores são altamente expressos em regiões que envolve o processo cognitivo como o proencéfalo basal, o núcleo septal medial, a banda diagonal e o núcleo basal, responsável também pelo déficit colinérgico na DA. Estudos recentes indicam que o peptídeo  $\beta$ A é responsável pela inativação dos receptores nicotínicos  $\alpha 7$ , o que causa a disfunção neuronal e morte celular (DINELEY et al., 2001; KADIR et al., 2006; WANG et al., 2010; PARRI; HERNANDEZ; DINELEY, 2011).

### 1.2.2 Hipótese Amiloidogênica

O peptídeo  $\beta$ A modifica as proteínas e lipídeos, induz a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*, ROS), principalmente ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, desencadeia um processo inflamatório e excitotoxicidade que leva a morte neuronal (**Figura 1**) (ADAM-VIZI; STARKOV, 2010; KIM et al., 2015; PICANÇO et al., 2017). Três oligômeros  $\beta$ A foram detectados e isolados de cérebros de pacientes com DA ou de camundongos transgênicos: dímeros e trímeros de peptídeo  $\beta$ A e o fragmento  $\beta$ A<sub>52</sub>, sendo que este último está correlacionado com duas proteínas Tau (REED et al., 2011; LESNÉ et al., 2013).

As sequências de peptídeos  $\beta$ A predominantes nos neurônios na DA são a  $\beta$ A<sub>1-40</sub> e  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, entretanto, recentemente verificou-se que um fragmento menor, o  $\beta$ A<sub>25-35</sub> induz um aumento na expressão da APP, geração do peptídeo  $\beta$ A<sub>1-42</sub> e aumento da fosforilação da

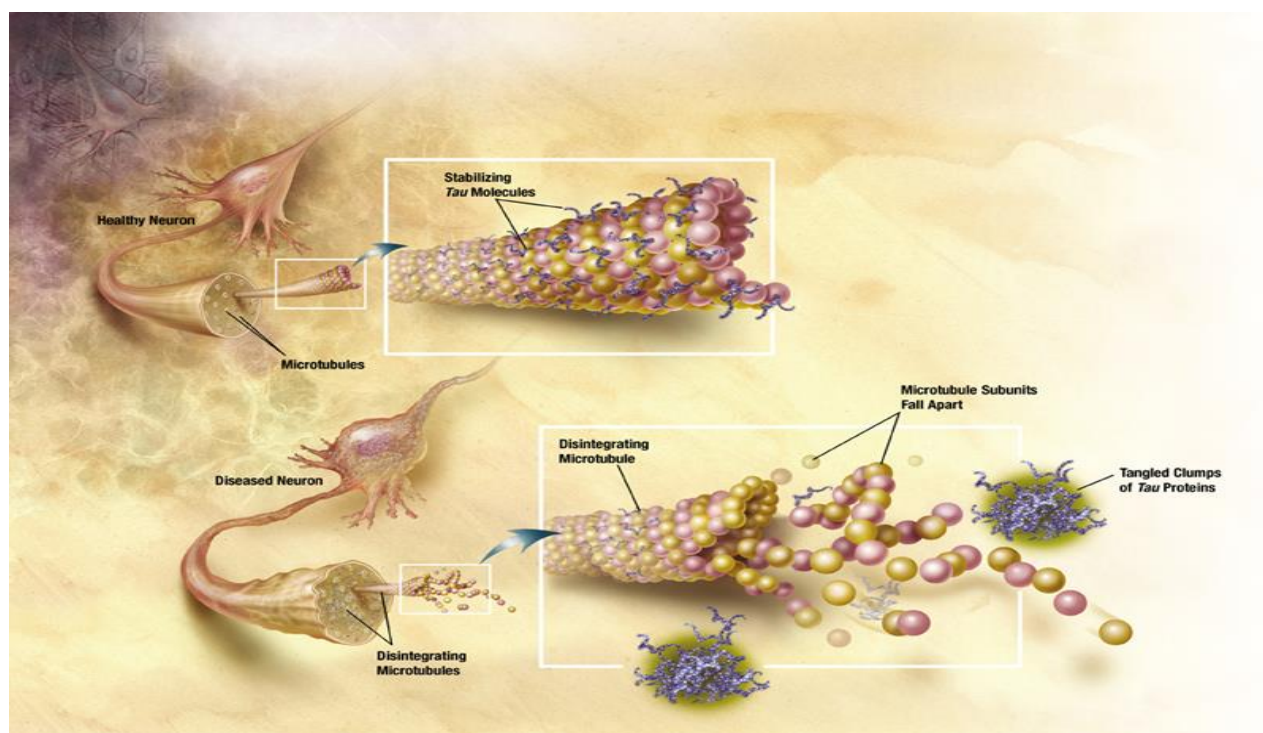


BERTRAM et al., 2007; LEDUC; JASMIN-BÉLANGER; POIRIER, 2010; MORIHARA et al., 2014).

### 1.2.3 Hiperfosforilação da Proteína Tau

A proteína Tau é uma proteína associada ao microtúbulo (PAM) encontrada nos axônios e sua função principal é estabilizá-los, pois estes são fundamentais para o transporte de neurotransmissores e para as sinapses. Os microtúbulos se mantêm íntegros devido ao estado fosforilado da Proteína Tau, que é regulado por fosfatases e proteínas cinases. Quando ocorre alguma instabilidade com essas enzimas, a proteína Tau se torna hiperfosforilada, desestabilizando os microtúbulos e formando os emaranhados neurofibrilares (**Figura 2**) (TERWEL; DEWACHTER; VAN LEUVEN, 2002; AVILA et al., 2004; FERRER et al., 2005; HASHIGUCHI, M.; HASHIGUCHI, T., 2013).

**Figura 2** – Processo de formação dos emaranhados neurofibrilares



**Fonte:** National Institute on Aging

A Glicogênio Sintase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) é uma das enzimas que fosforila a proteína Tau e está associada à neurodegeneração que ocorre na DA. A GSK possui duas isoformas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e ambas desencadeiam um aumento na produção de peptídeo  $\beta$ A. Entretanto, o depósito desses peptídeos ocorrem antes do acúmulo dos emaranhados neurofibrilares e esses oligômeros  $\beta$ A aceleram a hiperfosforilação da proteína Tau

(PHIEL et al., 2003; DIAZ-HERNANDEZ et al., 2012; HURTADO et al., 2012; SCHMITT et al., 2012; REVETT et al., 2013; KITAGISHI et al., 2014).

Foi observada uma diminuição na fosforilação da proteína Tau, melhora no comportamento cognitivo, memória e redução do estresse oxidativo de camundongos administrados com um oligonucleotídeo antisense GSK. Além disso, observou-se um aumento nos níveis no fator eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (NrF2) e, consequentemente, aumento nas concentrações de muitos antioxidantes (FARR et al., 2014). Em estudo recente, foram analisados cérebros post mortem de pacientes com DA após receberem tratamento de imunoterapia com peptídeo  $\beta$ A e foi observado uma redução nas formas total, inativa e ativa da GSK-3 $\beta$  (AMIN et al., 2015).

### 1.3 ENFOQUES TERAPÊUTICOS

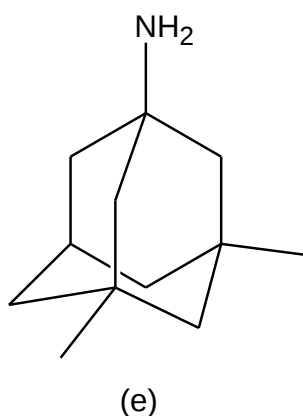
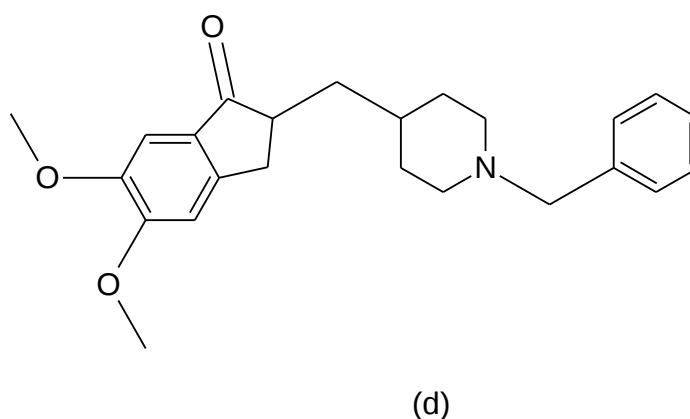
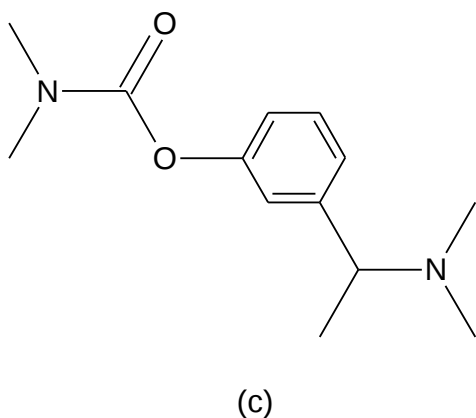
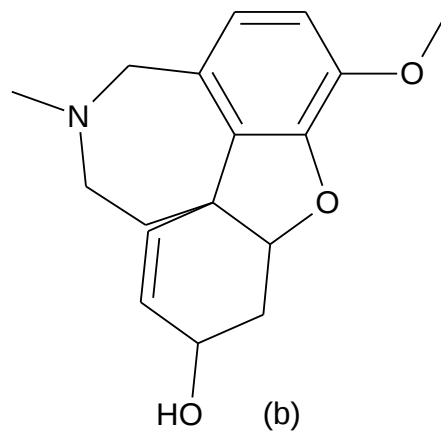
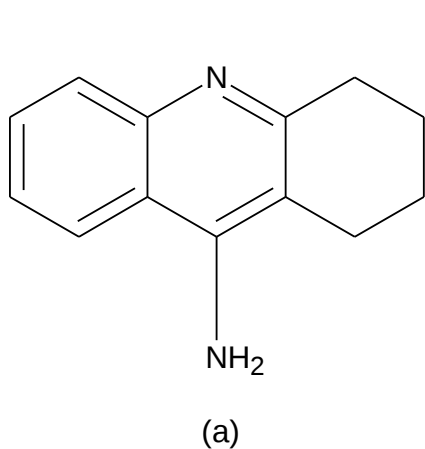
#### 1.3.1 Inibidores da Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor responsável pela memória, aprendizado e respostas emocionais. Na DA há uma perda da atividade da ACh, devido a atrofia de células neuronais colinérgicas, uma característica fisiopatológica da doença, resultando na diminuição dos níveis de ACh e, consequentemente, levando ao comprometimento cognitivo (DUNNETT et al., 1993; ANAND et al., 2012).

A colina acetiltransferase (CAT), que catalisa a síntese de ACh a partir da colina e da acetilcoenzima A, é produzida no *nucleus basalis* de Meynert, esse, apresenta-se atrofiado na DA causando deficiência de ACh. Este neurotransmissor é, posteriormente, degradado em acetato e colina pela AChE na fenda sináptica. (MARTOCCHIA; FALASCHI, 2008; ALMEIDA, 2011).

Estudos recentes revelaram a ação inibitória de diversas substâncias sobre a AChE para aumentar os níveis de ACh nos neurônios. Não obstante, existem fármacos, usados terapeuticamente, que foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) como: a tacrina (Cognex®) (**Figura 3.a**), galantamina (Nivalin®) (**Figura 3.b**), rivastigmina (Exelon®) (**Figura 3.c**) e o donepezil (Aricept®) (**Figura 3.d**) (BURNS et al., 1999; FARLOW, 2002; BRASSEN; ADLER, 2003; GELDMACHER et al., 2003; LANCTÔT et al., 2003; RELKIN et al., 2003; RODRIGUEZ et al., 2004; HSIUNG; FELDMAN, 2008; BABILONI et al., 2013).

**Figura 3** – Fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento de DA. (a) tacrina, (b) galantamina, (c) rivastigmina, (d) donepezil e (e) memantina.



Fonte: ChemDraw® Ultra

A Tacrina (1,2,3,4-tetrahydroacridina) é um inibidor reversível não competitivo da AChE e butilcolinesterase (BChE). Foi aprovada para uso clínico pela FDA em 1993, apresentando uma potente atividade anticolinesterásica, todavia, esse fármaco apresentou alta hepatotoxicidade sendo retirado do mercado. Não obstante, a tacrina está sendo usada como protótipo em estudos de planejamento de novos candidatos a fármacos com

ação inibitória da AChE. Além do que, híbridos desse inibidor foram sintetizados, como os híbridos tacrina-flurbiprofeno e tacrina-cumarina, para avaliar suas atividades anticolinesterásica e antibutilcolinesterásica (KNAPP et al., 1994; WATKINS et al., 1994; CHEN et al., 2013; ROMERO et al., 2013; HAMULAKOVA et al., 2014).

O donepezil foi o segundo fármaco aprovado pela FDA para o tratamento da DA, em 1996, demonstrando melhores propriedades que a tacrina, com baixa toxicidade, alta seletividade para AChE e tempo de meia vida mais longo. Interage com o sítio ativo e também com o sítio aniônico periférico (PAS) da AChE. Recentemente, estudos mostraram que o donepezil inibe os canais hERG, o que pode ser responsável pelos seus efeitos adversos, como o prolongamento do intervalo QT e arritmia do tipo Torsades de Pointes (GELDMACHER, 2004; TANAKA; KOGA; HIRAMATSU, 2009; ANAND; SINGH, 2013; CHAE et al., 2015).

A rivastigmina é um composto sintético derivado do alcaloide fisostigmina e que possui um perfil terapêutico melhor e mais seguro. Inibe ambas as colinesterases (AChE e BChE) e seu uso foi aprovado em 2000. Em estudo recente, uso da rivastigmina resultou na redução no déficit cognitivo induzido por cetamina em ratos com esquizofrenia (KONRATH et al., 2013; ZUGNO et al., 2013).

A galantamina é um alcaloide, inibidor competitivo e reversível da AChE, modula os receptores da ACh e aumenta sua liberação. É menos potente, porém menos tóxico que a tacrina. Assim como a tacrina, apresenta muitos estudos de desenvolvimento e síntese de novos fármacos derivados desse composto (HARVEY, 1995; ANAND; SINGH, 2013).

Além dos inibidores da ACh, existe outro fármaco aprovado pela União Europeia em 2002, e aprovado pela FDA em 2003, a memantina (1-amino-3,5-dimetil adamantano) (Namenda®) (**Figura 3.e**). Este medicamento é um inibidor não competitivo e reversível do receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA), e atua inibindo a ação excitatória excessiva do Glutamato, diminuindo moderadamente os sintomas cognitivos e não cognitivos da DA. Entretanto, estes medicamentos apresentam efeitos colaterais como: tontura, náusea, vômito, diminuição da frequência cardíaca, incontinência, dor de cabeça e confusão (GAUTHIER et al., 2008; CAPPELL et al., 2010; BABILONI et al., 2013; HYDE et al., 2013).

### 1.3.2 Inibidores da beta-secretase (BACE-1)

A enzima beta-secretase (BACE-1) é uma protease aspártica que cliva o APP, gerando o peptídeo  $\beta$ A. O acúmulo deste peptídeo resulta na formação de radicais livres,

desregulação de cálcio, dano na membrana neuronal e inflamação. Estudos recentes sugerem que a ACh aumenta a atividade do peptídeo  $\beta$ A (HARDY; SELKOE, 2002; LUO et al., 2003; ANAND et al., 2012; BOWERS et al., 2013).

A BACE-1 pode ser um importante alvo farmacológico para o desenvolvimento de novos fármacos usados para o tratamento da DA. Substâncias baseadas na estrutura do 1,4-benzodiazepino estão sendo analisadas como potenciais inibidores da BACE-1. Um derivado da Tacrina, o Bis(7)-tacrina, foi estudado recentemente como inibidor da BACE-1 (FU et al., 2008; BUTINI et al., 2013; LÉON et al., 2013).

Ademais, estudos demonstram que o conhecimento de características chaves na estrutura de cumarinas auxiliam no desenvolvimento e síntese de novos análogos que apresentam ação inibitória e diminuem a formação de peptídeos  $\beta$ A (SOTO-ORTEGA et al., 2011, ANAND et al., 2012). Na década de 90, demonstrou-se que o peptídeo  $\beta$ A interage com o PAS da AChE, promovendo o acúmulo deste peptídeo. Esse fenômeno é denominado de ação não colinérgica da AChE (DE FERRARI et al., 2001; LÉON et al., 2013). O composto 2-(3-(benzo[d]tiazol-2-il)ureido)acetato (KHG21834) inibiu a apoptose de neurônios induzida pelo peptídeo  $\beta$ A, a ativação de células da micróglia e o estresse oxidativo, bem como regula os níveis de GSK-3 $\beta$  (KIM et al., 2015).

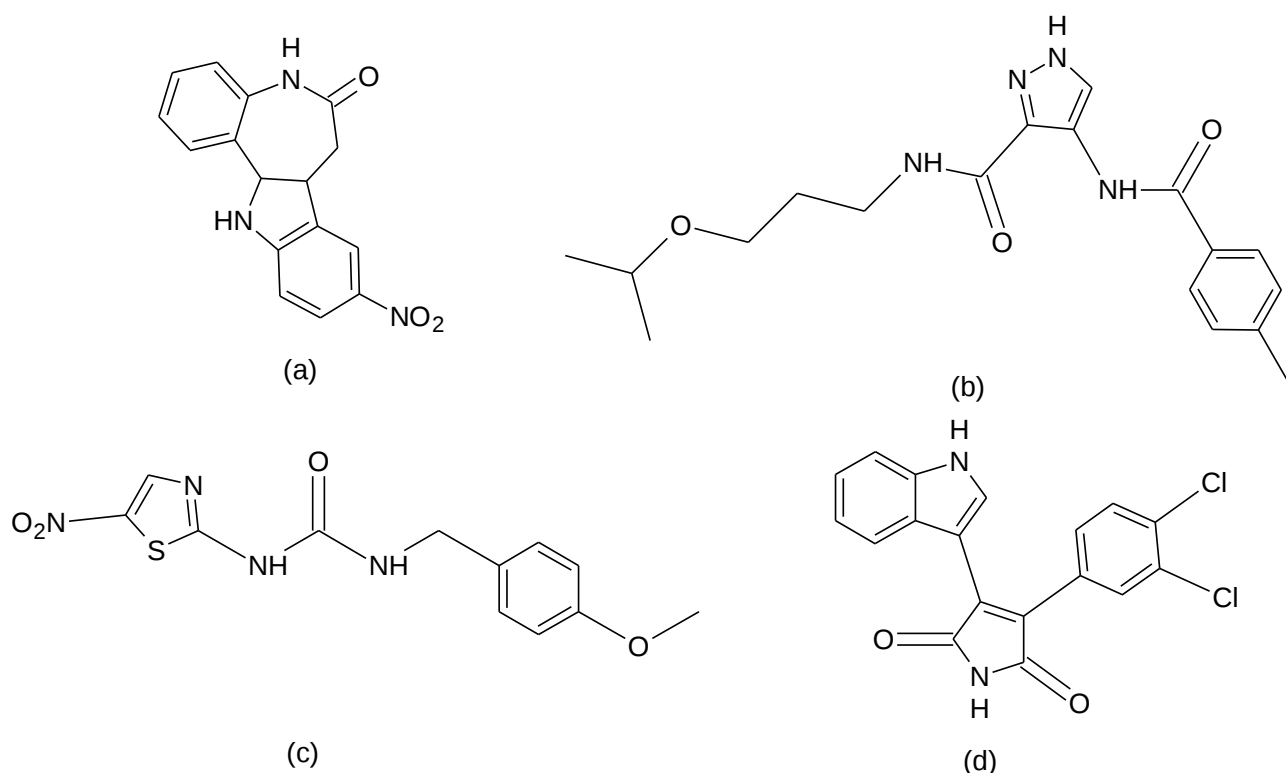
### 1.3.3 Inibidores da Glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3 $\beta$ )

A GSK-3 é uma enzima quinase presente nas células em duas formas, a GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$ , sendo que esta última regula diversos processos celulares e atua em importantes vias de sinalização, como o metabolismo do glicogênio, transcrição gênica, apoptose e inflamação. A GSK-3 ativa o fator nuclear de transcrição  $\kappa$  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ), que é responsável pela produção de citocinas inflamatórias como Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral (TNF). O processo inflamatório é um dos motivos para a perda cognitiva na DA. Sua desregulação é característica em várias doenças como o câncer, diabetes, DA esquizofrenia e transtorno bipolar. A GSK-3 $\beta$  também interfere na clivagem do APP e regula a produção do peptídeo A $\beta$ , dessa forma, a inibição da GSK-3 $\beta$  reduz a formação de placas amiloides mediadas pela BACE-1 (DOBLE; WOODGETT, 2007; FORDE; DALE, 2007; JOPE et al., 2007; CAI et al., 2012; PRADO, 2012; LY et al., 2013; LLORENS-MARTIN et al., 2014).

Nos últimos anos, algumas substâncias apresentaram ação inibitória contra a GSK-3 $\beta$ , como o Alsterpaullona (LEOST et al., 2000) (**Figura 4.a**), um inibidor ATP-competitivo da GSK-3 $\beta$  e da quinase dependente de ciclina 2 (CDK2). O 6-metil-N-[3- [[3- (1-metiletil)

propil] carbamoil] -1H-pirazol- 4-il] piridina-3-carboxamida (UNO et al., 2009) (**Figura 4.b**) e os análogos da maleimida, mais especificamente a substância SB-21676310 (COGHLAN et al., 2000) (**Figura 4.c**) e a substância AR-A01441811 (BHAT et al., 2003) (**Figura 4.d**) apresentaram potente atividade inibitória da GSK-3 $\beta$  (IC<sub>50</sub> de 9 nM e 104 nM, respectivamente) (BERG et al., 2012).

**Figura 4** – Inibidores da GSK-3 $\beta$ . (a) Alsterpaullona, (b) 6-metil-N-[3- [[3- (1-metiletil) propil] carbamoil] -1H-pirazol- 4-il] piridina-3-carboxamida, (c) AR-A01441811 e (d) SB-21676310



Fonte: ChemDraw® Ultra

O bis-indola (HERS et al., 1999) ou anilina (SMITH et al., 2001) maleimidadas, kenpaullona (LEOST et al., 2000), indirubina (LECLERCQ et al., 2001) e o hImenialdisina (MEIJER et al., 2000), tiazolidinonas (GIL et al., 2000) (inibidor ATP-não competitivo) também apresentaram atividade inibitória para GKS-3 $\beta$ . Estudos revelaram que os sais de lítio são potentes inibidores da GSK-3 $\beta$ , podendo reduzir os sintomas da DA (NUNES et al., 2007; KESSING et al., 2008; MENDES et al., 2009; FORLENZA et al., 2011).

#### 1.4 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

O planejamento e desenvolvimento de fármacos engloba a inovação, descoberta, síntese, extração, isolamento, identificação de substâncias bioativas e a relação estrutura atividade (REA). O planejamento racional de fármacos pode ser dividido em duas categorias: planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor, (do inglês, *structure-based drug design*, SBDD) e planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante, do inglês, *ligand-based drug design* (LBDD) (MANDAL et al., 2009; CERA; PANCOTE, 2013; KOSEKI; AOKI, 2014).

O SBDD desenvolve moléculas com estrutura tridimensional e com função em processos celulares conhecidos e que apresentem ação biológica em biomoléculas. O LBDD desenvolve moléculas com propriedades predefinidas para alvos, cujas funções celulares e informações estruturais podem ser conhecidas ou desconhecidas. Este método inclui o modelo farmacofórico, a relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR), modelagem por homologia e pesquisa de pares moleculares correspondentes (MMP) (MANDAL et al., 2009; KOSEKI; AOKI, 2014).

A geração de um modelo farmacofórico permite identificar a região da molécula responsável por sua atividade biológica através do arranjo 3D de compostos que apresentam características estruturais semelhantes. Esse método permite interpretar as interações que podem ocorrer entre a macromolécula e um ligante (GUNER et al., 2004; MATHURA et al., 2010; ABBASI et al., 2012; WANG et al., 2012).

O SBDD é fundamental para busca de novos candidatos a fármacos. Os métodos utilizados nessa abordagem são: Método de Estimação da Afinidade de Ligação, Função de Energia Empírica, Cálculo de Energia Livre Baseado na Dinâmica Molecular e *Docking* Molecular (HONARPARVAR et al., 2014).

A principal estratégia do SBDD é a simulação de *docking*. Os programas de *docking* molecular fornecem possíveis conformações do complexo proteína-ligante, ou seja, as possíveis orientações que um ligante assume no interior do sítio ativo de um receptor, e estima suas ligações com base em algoritmos de encaixe e funções de escore. Envolvem função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de pontes de hidrogênio, hidrofóbicos, a qual gera modelos matemáticos que predizem as melhores orientações do ligante, segunda uma lista de escores de energia (CODDING, 1998; ALMEIDA, 2011; ELKAMHAWY et al., 2014). Além disso, o *docking* molecular requer uma distinção de verdadeiros e falsos positivos no SBDD. Porém, a precisão dos estudos de *docking* molecular são altamente dependentes da seleção de programas e de estruturas da proteína-alvo (FRIESNER et al., 2004; HALGREN et al., 2004; LEACH et al., 2006; KOSEKI; AOKI, 2014).

## 1.5 FÁRMACOS MULTIALVOS

Os fármacos direcionados a um único alvo nem sempre podem modificar sistemas complexos, como no caso de doenças cardiovasculares, câncer, depressão e doenças neurodegenerativas que irrompem de múltiplas anormalidades moleculares e bioquímicas. Recentemente, uma nova abordagem está sendo empregada para suprir essa falta de eficácia de compostos com apenas um alvo. Essa estratégia inclui ligantes com múltiplos alvos que podem se transformar em fármacos mais eficazes, uma vez que tornam o sistema biológico mais sensível a ação da droga (ZIMMERMANN; LEHÁR; KEITH, 2007; HARRIS; PIERPOINT, 2012).

No planejamento de fármacos multialvos, os ligantes interagem com dois ou mais alvos biológicos para combater uma determinada doença. Esta abordagem reduz o tempo e o custo necessário para a realização dos ensaios clínicos (CORBETT et al., 2012; BANSODE et al., 2014). Devido à complexidade da fisiopatologia e a possibilidade de apresentar múltiplos alvos, essa estratégia tem sido aplicada para o planejamento de novos fármacos para o tratamento da DA. Na terapia do câncer, depressão e esquizofrenia, essa abordagem já é utilizada (YOUUDIM, BUCCAFUSCO; 2005; ESPINOZA-FONSECA, 2006; NIELSCH, et al., 2007; CAVALLI et al. 2008; MILLAN, 2009; IQBAL; GRUNDKE-IQBAL, 2010; WONG et al., 2010; BAJDA et al., 2011; BOLOGNESI et al., 2011; BOLEA et al., 2013).

Os múltiplos mecanismos patológicos da DA têm incentivado o desenvolvimento de pesquisa de ligantes multialvos, o que pode ser de extrema importância clínica. O efeito sinérgico de um fármaco multialvo pode diminuir problemas de farmacocinética e interações medicamentosas relacionados à polifarmacoterapia (SCHMITT, et al., 2004; VAN DER SCHYF et al., 2006; CARREIRAS et al., 2013; GELDENHUYS et al. 2013; MAO et al., 2014; ROCHAIS et al., 2015).

A memoquina, um dos primeiros candidatos a fármacos multialvos contra a DA, e seus derivados híbridos apresentam diferentes subunidades farmacofóricas de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, inibem a agregação do peptídeo  $\beta$ -amiloide e inativam a enzima AChE (CAVALLI et al., 2007; BOLOGNESI et al., 2011; PRATI et al., 2013). Em um estudo sobre fármacos multialvos, derivados da cumarina apresentaram ação inibitória sobre o receptor BACE-1 e a enzima AChE. Foram utilizados a substância AP2243 (derivado do AP2238), que apresenta atividade AChE, e derivados de cumarina cujo grupo metóxi foi substituído por uma cadeia amídica para aumentar a atividade contra a BACE-1 (PIAZZI et al., 2008).

Combinando o resveratrol (inibe a agregação  $\beta$ A e possui ação antioxidante) e a região farmacofórica do clioquinol (quelante de metal), foram obtidos candidatos a fármacos multialvo, derivados do resveratrol, para o tratamento da DA. Os compostos (E)-2-((4- (3,5-Dimetoxiestiril) fenilamino) metil) -6-me-oxo-fenol e (E)-3-((4- (3,5-Dihidroxiestiril) fenilamino) metil) -benzeno-1,2-diol exibiram uma inibição significativa da agregação  $\beta$ A, desagregação das placas senis já formadas, habilidade de quelante metais, atividade antioxidante, inibição da Monoamina Oxidase- A e B (MAO-A e MAO-B), moderada inibição da AChE e baixa neurotoxicidade (LU et al., 2013).

Segundo Huang et al. (2012), o composto 5,6-di-hidroxi-2- (4- (metil (propil) amino) benzilideno)-2,3-di-hidro-1H-inden-1-ona 4-metilbenzenossulfonato, um derivado benzilideno-indanona, apresentou atividade multifuncional (inibição contra agregação do peptídeo  $\beta$ A e da atividade da MAO-B, ação antioxidante e quelante de biometais contra a DA, mostrando-se um potencial candidato a fármaco multialvo. Derivados do Resveratrol foram sintetizados e apresentaram atividade inibitória contra colinesterases, agregação  $\beta$ A e MAO-A e B, enquanto que híbridos do tacrina-benzofurano inibiram a atividade de colinesterases e a BACE- 1 e, conseqüentemente, o acúmulo do peptídeo  $\beta$ A (PAN et al., 2014; ZHA et al., 2016).

Utilizando fragmentos das estruturas do resveratrol, do clioquinol, e do grupo benziloxi (da 7- (3-clorobenziloxi)-4-formilcumarina, inibidor da MAO-B), foram sintetizados derivados de saliciladimina, dentre eles, o composto (E)-4-(((4-(Benziloxi) fenil) imino) metil) benzeno-1,2,3-trio, que possui atividade contra a agregação  $\beta$ A ( $IC_{50}$  = 25  $\mu$ M) e MAO-B ( $IC_{50}$  = 0,39  $\mu$ M), efeitos antioxidantes, habilidade de quelante de metal e baixa toxicidade celular (YANG et al., 2017).

A primeira classe de compostos capazes de inibir, simultaneamente, a BACE-1 e GSK-3 $\beta$  são as triazinonas (6-amino-4-fenil-3,4-di-hidro-1,3,5-triazin-2 (1H)-onas). Uma dessas moléculas apresentou  $IC_{50}$  = 18,03 $\pm$ 0,01  $\mu$ M e 14,67 $\pm$ 0,70  $\mu$ M para BACE-1 e GSK-3 $\beta$ , respectivamente. Foram utilizadas as regiões farmacofóricas responsáveis pela interação da BACE-1 (grupo guanidino) e GSK-3 $\beta$  (amida cíclica), sendo constatado que essas triazinonas são compostos promissores para o desenvolvimento de protótipos com ação inibitória para ambas as enzimas, BACE-1 e GSK-3 $\beta$ , envolvidas na progressão da DA (PRATI et al., 2014).

Recentemente, derivados da dihidropiridina demonstraram interação com as estruturas da AChE e BACE-1. Ademais, híbridos de cianopiridina-triazina apresentaram atividade contra a AChE, assim como a interação simultânea com sítio catalítico (CAS) e o sítio aniônico periférico (PAS) da AChE, redução do acúmulo do peptídeo  $\beta$ A e do

estresse oxidativo. Tal qual, derivados de oxoisofofina também tiveram ação inibitória contra a AChE e reduziram a agregação  $\beta$ A (GOYAL et al., 2014; MAQBOOL et al., 2016; WEI et al., 2016).

## 1.6 DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTI-ALZHEIMER

Inúmeras plantas medicinais apresentam atividade anti-inflamatória, neuroprotetora, anticolinesterásica e que inibem a hiperfosforilação da proteína Tau, sendo utilizadas para o tratamento da DA. Dentre essas plantas estão: *Acorus calamus*, *Centella asiatica*, *Ginkgo biloba*, *Huperzia serrata*, *Indigofera tinctoria*, *Magnolia officinalis* e *Salvia officinalis* (WANG; DUBOIS; ADAMS JR, 2014).

Alguns compostos derivados de plantas possuem ação inibitória para a AChE, principalmente, os alcaloides, classe de metabólitos secundários que possui a maioria dos candidatos a fármacos usados no tratamento da DA (**Tabela 1**). Esses metabólitos têm como característica apresentar em sua estrutura um nitrogênio carregado positivamente, importante para realizar interação iônica com o sítio ativo da AChE. Dentre as classes de alcaloides com ação anticolinesterásica estão: os alcaloides esteroidais e terpênicos; alcaloides do tipo quinolizidina/lycopodium; alcaloides tipo isoquinolina; alcaloides indólicos e alcaloides  $\beta$ -carbonílicos (PEREIRA et al., 2010; ORHAN, 2012; KONRATH et al., 2013).

**Tabela 1** – Descrição dos derivados de Produtos Naturais com atividade anti-Alzheimer

|    | Substância                 | Espécie                                                                        | Classe de Metabólito | Principal função                                                      | IC <sub>50</sub> | Referência                                     |
|----|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------|
| 1  | Fisostigmina               | <i>Physostigma venenosum</i>                                                   | Alcaloide            | Inibidor da AChE                                                      | 0,022µM          | JACKISCH et al., 2009                          |
| 2  | Huperzina A                | <i>Huperzia serrata</i>                                                        |                      | Inibidor da AChE<br>Antagonista dos receptores NMDA                   | 0,036µM          | ZHAO et al., 2013                              |
| 3  | Galantamina                | <i>Lycoris radiata</i> ,<br><i>Galanthus nivalis</i> e<br><i>Narcissus spp</i> |                      | Inibidor seletivo da AChE                                             | 0,36µM           | BARTOLUCCI et al., 2001                        |
| 4  | Licoramina                 | <i>Lycoris radiata</i>                                                         |                      | Inibidor da AChE                                                      | 61,56µM          | SHI et al., 2014.                              |
| 5  | Berberina                  | <i>Coptis chinensis</i>                                                        |                      | Inibidor da MAO<br>Inibidor da agregação βA                           | 118,92µM         | LEE et al., 2011.                              |
| 6  | Coptisina                  |                                                                                |                      | Inibidor da AChE                                                      | 0,80µM           | JUNG et al., 2009.                             |
| 7  | Palmatina                  |                                                                                |                      | Inibidor da AChE                                                      | 0,52 µM          | JUNG et al., 2009.                             |
| 8  | Dehidroevodia mina         | <i>Evodia rutaecarpa</i>                                                       | Acetofenona          | Inibidor da AChE                                                      | 37,8µM           | PARK et al., 1996;<br>JUNG; PARK et al., 2007. |
| 9  | Apocinina                  | <i>Picrothiza kurroa</i>                                                       |                      | Reduz a proliferação de peptídeos β-amiloide                          | 10µM             | STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008                     |
| 10 | Diosmina                   | <i>Hyssopus officinalis</i>                                                    | Flavonoide           | Reduz a geração de peptídeos β-amiloides                              | -                | SAWMILLER et al., 2016                         |
| 11 | Epigallocatequina-3-galato | <i>Camellia sinensis</i> (Chá verde)                                           | Polifenol            | Reduz a geração dos peptídeos Aβ <sub>1-40</sub> e Aβ <sub>1-42</sub> | 20µM             | REZAI-ZADEH et al., 2005                       |
| 12 | Luteolina                  | <i>Stigmaphyllon paralias</i>                                                  | Flavonoide           | - Reduz a geração de peptídeos β-amiloides<br>- Inibe a GSK-3         | 100µM            | PANDURANGAN et al., 2013                       |
| 13 | Resveratrol                | <i>Veratrum grandiflorum</i> e<br><i>Polygonum cuspidatum</i>                  | Polifenol            | - Inibe a polimerização do peptídeo β-amiloide                        | 100µM            | BALKIS et al., 2015                            |

Recentemente, análogos da isoquinolina (tipo de alcaloide) foram sintetizados e apresentaram propriedades, *in vitro*, de inibição da AChE e agregação do peptídeo βA (XU et al., 2014). Outra classe de metabólito que possui propriedades neuroprotetora e atividade anticolinesterásica é a classe dos flavonoides, que possuem também ação inibitória na formação do peptídeo βA e proteção contra a ação de radicais livres,

processos fundamentais no desenvolvimento da DA (SCHROETER et al., 2001; LOU et al., 2011; URIARTE-PUEYO; CALVO, 2011).

Um alcaloide que apresenta propriedades anticolinesterásica é a Fisostigmina (alcaloide indólico), obtido de uma planta nativa na África, a *Physostigma venenosum* Balf. (Fabaceae). A Fisostigmina é um inibidor reversível da AChE e da BChE e, apesar deste composto inibir a ação dessas duas enzimas, sua atividade inibitória enzimática *in vitro* é maior contra a AChE (BITZINGER et al., 2016). Em estudo, esse alcaloide além de aumentar a concentração de ACh no plasma e no córtex cerebral em ratos com o fígado parcialmente resseccionado, também apresentou um efeito anti-inflamatório, pois reduz os níveis de interleucina 1 $\beta$  (PLASCHKE; MÜLLER; KOPITZ, 2014). Além disso, a Fisostigmina aumenta a atividade neuronal e induz a proliferação celular via óxido nítrico em Zebrafish (LEE et al., 2016).

A Fisostigmina é usada para tratar a DA, glaucoma, esvaziamento gástrico lento e hipotensão ortostática, além de ser utilizada em crises de overdose de atropina e escopolamina. Há também relatos do uso de infusão intravenosa contínua da Fisostigmina para tratar o delírio colinérgico decorrente de overdose da olanzapina. Porém, seu uso clínico é limitado devido ao seu curto tempo de meia-vida, sua janela terapêutica limitada e seus efeitos gastrointestinais e ortostáticos (THAL et al., 1996; HAIL; OBAFEMI; KLEINSCHMIDT, 2013; KONRATH et al., 2013; LIU et al., 2013).

Estudos relatando a síntese da Fisostigmina foram realizados. Esse alcaloide pode ser sintetizado a partir de derivados de cinamoil, através de uma rota paralela e eficiente, por uma reação de hidroformilação catalisada por complexos de ródio (CHIOU et al., 2013). A síntese total desse metabólito também pode ser observada ao realizar um rearranjo de Johnson–Claisen para a formação de estereocentros quaternários no carbono terciário de compostos de lactâmicos (PANDEY; KHAMRAI; MISHRA, 2018). Todavia, devido ao seu uso clínico limitado, alguns análogos da Fisostigmina estão sendo desenvolvidos com o intuito de buscar novos candidatos a fármacos que apresentem uma melhor atividade (CHIOU et al., 2013; KONRATH et al., 2013; WANG et al., 2016).

Outro alcaloide que apresenta atividade anticolinesterásica é a Huperzina A, isolado da planta medicinal chinesa, *Huperzia serrata* (RAVES et al., 1997). A Huperzina A mostrou uma melhora na função cognitiva e nas atividades cotidianas de pacientes com DA. Além disto, esse inibidor reversível da AChE tem ação mais potente e mais específica no córtex cerebral de ratos que outros inibidores como tacrina, donepezil, rivastigmina e fisostigmina. (ZHAO; TANG, 2002; YANG et al., 2013; DAMAR et al., 2017). Além disso, a Huperzina A apresenta também ação inibitória nos receptores NMDA, diminui a produção

do peptídeo  $\beta$ A e possui um efeito anticonvulsivante, em ratos administrados com pentilenotetrazol, por aumento da transmissão GABAérgica (ZHANG et al., 2000; GERSNER et al., 2015; LEI et al., 2015).

A Galantamina é um alcaloide isolado da *Galanthus woronowii* e *Lycoris radiata*, inibidor reversível e competitivo da AChE usado no tratamento da DA moderada aprovado pela FDA em 2001 (BORES et al., 1996; LOY; SCHNEIDER, 2006; CHOI et al., 2013; KIMURA et al., 2014). A galantamina associada ao estradiol aumentou significativamente o desempenho cognitivo em ratos ovariectomizados (GIBBS et al., 2011) e também aumentou a inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (Prepulse inhibition of the startle, PPI) em ratos normais e melhorou a interrupção do PPI induzida por MK-801 (Dizocilpina), o que significa que esse alcaloide pode apresentar uma melhora na pré-cognição na esquizofrenia (SHAO et al., 2014). Outrossim, recentemente análogos da Galantamina com atividade inibitória para a AChE estão em desenvolvimento, com o objetivo de buscar candidatos a fármacos mais eficazes (BUCKLER et al., 2017).

Existem também outros alcaloides, não tão estudados, mas que também possuem atividade anti-Alzheimer como, por exemplo, o alcaloide da mesma família da Galantamina (Amaryllidaceae), a Dihidrogallantamina ou licoramina, além de inibir a ação da AChE, é usada para aliviar os sintomas da paralisia infantil e miastenia gravis (LIANG et al., 2004; XIANG; CHEN; CHEN, 2014). Alcaloides da família Amaryllidaceae possuem atividade neuroprotetora com contra o peptídeo  $\beta$ A e atividade anticâncer (LI et al., 2013; HAVELEK et al., 2017).

Outro importante alcaloide que apresenta ação inibitória da AChE é a Coptisina, que também tem efeito anti-hiperlipidêmico e diminui a hiperosforilação da proteína Tau (HE et al., 2015; KAUFMANN et al., 2016; YANG et al., 2017). Estudos demonstram que a Berberina, alcaloide tipo isoquinolina, derivado de inúmeras plantas medicinais como a *Hydrastis canadenses*, é um produto natural que inibe a agregação de peptídeo  $\beta$ A, diminui a hiperfosforilação da proteína Tau e inibe o estresse oxidativo na DA (LIU et al., 2014; AHMED et al., 2015; HAGHANI; SHABANI; TONDAR, 2015; CAI; WANG; YANG, 2016).

A Palmatina, outro alcaloide tipo isoquinolina, pode ser extraída das plantas *Berberis aetnensis* e *Berberis libanotica*, assim como a Berberina. A atividade de inibição contra a AChE deste último é maior (2,2  $\mu$ g/mL), porém, a Palmatina é mais ativa contra a BChE (105,1  $\mu$ g/mL) (BONESI et al., 2013). A berberina e a palmatina inibem sinergicamente a AChE, demonstrando que a combinação desses dois alcaloides pode ser uma estratégia terapêutica mais efetiva para o tratamento da DA (MAK et al., 2014).

A Dehidroevodiamina (alcaloide de quinazolina), extraída da planta *Evodia rutaecarpa*, é um inibidor da AChE que melhora o comprometimento da memória espacial em ratos com amnésia induzida por escapolamina, além de melhorar significativamente a aprendizagem e a memória de ratos que receberam infusão de peptídeo  $\beta$ A1-42 (PARK et al., 1996; PRESS, 2014; SHIN; KIM; SUH, 2017).

A Apocinina é um composto fenólico isolado da planta *Picrorhiza kurroa* e de outras espécies da família Apocymun. É inibidor de NADPH oxidase protege contra a disfunção renal induzida pela isquemia e reperfusão em ratos, inibe a progressão de placa aterosclerótica *in vivo*, suprime a geração de ROS induzido por LDL (do inglês, *Low Density Lipoproteins*) e o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos *in vitro*. Ademais, a apocinina também reduz o desenvolvimento da lesão isquêmica do miocárdio, inflamação e fibrogênese e tem atividade neuroprotetora, pois diminui os efeitos neuroquímicos da metanfetamina (SIMONYL et al., 2012; KINOSHITA et al., 2013; LIU et al., 2014; MILLER et al., 2014; CHOI et al., 2015).

Diosmina é uma flavona com efeito gastroprotetor, protege contra lesão de isquemia e reperfusão cerebral, previne a Síndrome de Hiperestimulação Ovariana, possui atividade anti-hiperlipidêmica e diminui os radicais livres (efeito cardioprotetor). Também possui um efeito na DA, pois reduz os níveis de peptídeo  $\beta$ A, a hiperfosforilação da proteína Tau, a neuroinflamação e comprometimento cognitivo em ratos (QUEENTHY; JOHN, 2013; LIU et al., 2014; ARAB et al., 2015; SAWMILLER et al., 2016; ZHU et al., 2017).

O Epigallocatequina-3-galato é uma catequina obtida do chá verde (*Camellia sinensis*) com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, anticarcinogênica, antiamiloidogênica e neuroprotetora (HIGDON; FREI, 2003; CAO et al., 2007; HYUNG et al., 2013; SHEN et al., 2015; MAHAJAN; BHAT; KUMAR, 2017). Estudos recentes demonstram a síntese de análogos multialvos derivados do Resveratrol para tratamento da DA. Esse composto se encontra em fase de estudo clínico e possui ações neuroprotetora, antioxidante e anti-inflamatória (BAUR; SINCLAIR, 2006; KWON et al., 2010; LU et al., 2013; BASTIANETTO; MÉNARD; QUIRION, 2015; TURNER, et al., 2015).

A Luteolina é um flavonoide presente em frutas e vegetais que possui atividade anti-inflamatória, antioxidante, anticâncer. Segundo estudo, esse flavonoide reverte os déficits cognitivos pela dieta rica em gorduras, pois inibe a via NF- $\kappa$ B em cérebros de camundongos. Outrossim, a luteolina reduz a ativação da GSK-3 $\beta$ , a fosforilação da proteína Tau, os níveis de peptídeo  $\beta$ A e a liberação de citocinas inflamatórias em ratos

com traumatismo craniano (KUO et al., 2011; CHIAN et al., 2014; LIU et al., 2014; SAWMILLER et al., 2014; ROY et al., 2015).

À vista disso, vários estudos estão sendo realizados em busca de compostos com a função de melhorar a cognição e a memória de pacientes com DA e a modelagem molecular tem grande impacto no planejamento desses novos fármacos, pois diminui os gastos e agiliza o processo da pesquisa para a obtenção de novos modelos de tratamento que interrompam ou diminuam a progressão da doença. Por conseguinte, esta pesquisa tem como objetivo propor novos candidatos a fármacos multialvo, derivados de produtos naturais, para o tratamento da DA.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Planejar novos candidatos a fármacos multialvo inibidores de acetilcolinesterase e glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  para tratamento da Doença de Alzheimer.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Realizar o estudo de *docking* molecular para os derivados de produtos naturais selecionados com as enzimas acetilcolinesterase e glicogênio sintase quinase 3 $\beta$ ;
- b) Derivar o padrão farmacofórico dos derivados de produtos naturais selecionados;
- c) Predizer as propriedades farmacocinéticas (ADME) e toxicológicas dos derivados de produtos naturais selecionados;
- d) Propor modificações nos derivados de produtos naturais selecionados que apresentaram os melhores resultados nas etapas anteriores para obtenção de um protótipo multialvo.

### 3.1 MODELAGEM MOLECULAR DOS DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS SELECIONADOS

Inicialmente, 13 compostos derivados de produtos naturais com atividade inibitória para a AChE e GSK-3 $\beta$  foram selecionados da literatura (DA ROCHA et al., 2011). Os derivados de produtos naturais foram chamados de produtos do conjunto de treinamento, e foram desenhados no programa ChemDraw® Ultra, otimizados com o método Hartree-Fock e a função de base 6-31G\*\* implementado no programa Gaussian 03 (FRISCH et al., 2003) e visualizado pelo programa GaussView 5.0 (DENNINGTON et al., 2009).

### 3.2 ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR USANDO O PROGRAMA GOLD 4.1

O *docking* molecular é um método computacional intensivo e proeminente no processo de descobrimento de fármaco. O benefício do *docking* é identificar o modo de ligação dos ligantes no sítio de ativo da enzima ou receptor através de interações-chave específicas e de prever a afinidade de ligação entre os complexos proteína-ligante (GUPTA; MOHAN, 2014).

O programa GOLD (do inglês, “Genetic Optimisation for Ligand *Docking*”) utiliza o algoritmo genético para fins de experimentos de *docking* flexível de ligantes dentro de sítios de ligação de proteínas. Uma população de soluções potenciais (isto é, possíveis orientações docadas dos ligantes) está configurada de forma aleatória (VERDONK et al., 2003). Cada membro da população é codificado como um cromossomo que contém as informações sobre o mapeamento de ligações de hidrogênio de átomos do ligante para (complementares) ligações de hidrogênio de átomos da proteína, mapeamento de pontos hidrofóbicos no ligante para pontos hidrofóbicos na proteína e a conformação em torno das ligações flexíveis do ligante e grupos hidroxílicos da proteína. Para prever como uma molécula pequena irá ligar-se a uma proteína é difícil e nenhum programa pode garantir sucesso. A próxima etapa a ser realizada é medir a maior precisão possível da confiabilidade do programa, isto é, a chance de que ele vai fazer uma boa predição em uma determinada instância. Por esse motivo, o GOLD tem sido testado com um grande número de complexos extraídos do Protein Data Bank (PDB). A conclusão geral desses testes foi que as soluções melhor classificadas pelo GOLD estavam corretas em 70-80% dos casos (VERDONK et al., 2003).

Para isso, uma estrutura cristalográfica de cada enzima estudada (AChE - PDB ID: 4M0E - Resolução: 2,0 Å e GSK-3 $\beta$  - PDB ID: 3Q3B – Resolução: 2,7 Å) em complexo com inibidor no sítio ativo foi selecionada. As estruturas cristalográficas das enzimas de AChE e de GSK-3 $\beta$  humanas em complexo com seus respectivos ligantes foram obtidas a partir do PDB no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (BERMAN et al., 2000). Essas estruturas foram preparadas para os experimentos adicionando átomos de hidrogênios, removendo íons, outros ligantes do sítio ativo e todas as moléculas de água. O programa GOLD 4.1 será usado para investigar os modos de ligação entre os derivados de produtos naturais selecionados e gerar um conjunto de conformações para esses ligantes.

Dada à estrutura cristalográfica do alvo, o *docking* molecular automaticamente apresenta amostras das conformações dos ligantes com uma região específica de ligação do receptor. Tem sido usado de maneira bem-sucedida para identificar substâncias ativas filtrando aqueles que não se encaixam no sítio ativo. O sítio de ligação das enzimas estudadas foi definido com todos os resíduos dentro de uma esfera de 10 Å de raio localizado ao centro do sítio ativo. Para a etapa inicial dos experimentos de *docking* alguns parâmetros do algoritmo genético (do inglês, *genetic algorithm*, GA) foram aplicados para buscar os modos de ligação dos derivados de produtos naturais selecionados mantendo-os rígidos, já que houve a necessidade de preservar a pose (conformação + orientação bioativa) similar do inibidor complexado originalmente utilizando como molécula de referência. Dez soluções de *docking* foram calculadas para cada produto natural selecionado.

Uma busca de máxima eficiência foi realizada (autoconfiguração de 100% de eficiência). Os melhores derivados de produtos naturais selecionados nesta etapa foram classificados de acordo com a função de pontuação ChemPLP, essa função classifica as orientações das moléculas avaliadas de acordo com um padrão de afinidade (escore), do ponto de vista de estabilidade energética, em relação ao sítio ligante da proteína. Uma inspeção visual foi realizada para a seleção das melhores poses dos derivados de produtos naturais selecionados que revelaram interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo de cada enzima estudada.

### 3.3 PREDIÇÃO DO PADRÃO FARMACOFÓRICO

O farmacóforo representa o conjunto de domínios funcionais das moléculas ligantes através dos quais se define os tipos de interação que os ligantes em comum fazem com o sítio receptor. A análise, por métodos computacionais, dos possíveis conjuntos de grupos farmacofóricos associados a cada molécula ativa, permite a derivação do padrão

farmacofórico comum ao conjunto de análogos ativos em questão. Um farmacóforo é o arranjo tridimensional (3D) de características que são essenciais para uma molécula ligante, a fim de interagir com um receptor de modo específico. A identificação de um farmacóforo pode servir como um modelo importante no desenvolvimento racional de fármacos, uma vez que pode auxiliar na descoberta de novas substâncias que podem ligar-se a um receptor alvo. Muitos métodos computacionais para identificação do padrão farmacofórico têm sido desenvolvidos (INBAR et al., 2007). Nesse estudo, o padrão farmacofórico foi determinado a partir do servidor online PharmaGist (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>) (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008).

O servidor PharmaGist gera farmacóforos 3D a partir de um conjunto de moléculas que são conhecidos por se ligarem a um receptor alvo comum. O método procura de forma eficiente por possíveis farmacóforos e relata os mais altos scores. Os farmacóforos candidatos são detectados por alinhamento múltiplo flexível dos ligantes de entrada, onde a flexibilidade dos ligantes é tratada de forma expressa e de uma maneira determinista no processo de alinhamento. Outra vantagem importante do método é a capacidade de detectar farmacóforos comuns para subconjuntos de ligantes de entrada, uma característica que faz PharmaGist tolerante a outliers e vários modos de ligação (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008).

### 3.4 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS (ADME) E TOXICOLÓGICAS (TOX) DOS DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS SELECIONADOS

As propriedades farmacocinéticas e a toxicidade dos compostos são uma das principais razões para que se encerre o desenvolvimento de candidatos a fármacos (GUPTA; MOHAN, 2014). Neste contexto, foram computadas algumas propriedades farmacocinéticas dos derivados de produtos naturais selecionados que incluirá o peso molecular, a área de superfície polar (PSA), logP (Coeficiente de partição), logBB (Coeficiente de partição cérebro/sangue), porcentagem de absorção oral humana, atividade predita no sistema nervoso central, permeabilidade aparente em Caco-2, entre outras usando o módulo QikProp do software Schrödinger.

O perfil de toxicidade dos derivados de produtos naturais selecionados foi avaliado usando o programa DEREK, que é um sistema especialista baseado no conhecimento para a predição qualitativa de toxicidade. O DEREK realiza essas predições tendo como base uma série de regras, e cada regra descreve a relação entre uma característica

estrutural ou um toxicóforo e sua toxicidade associada. Além de carcinogenicidade, pontos toxicológicos atualmente abrangidos pelo sistema do DEREK ainda incluem mutagenicidade, sensibilização da pele, irritação, teratogenicidade e neurotoxicidade (SANDERSON; EARNSHAW, 1991).

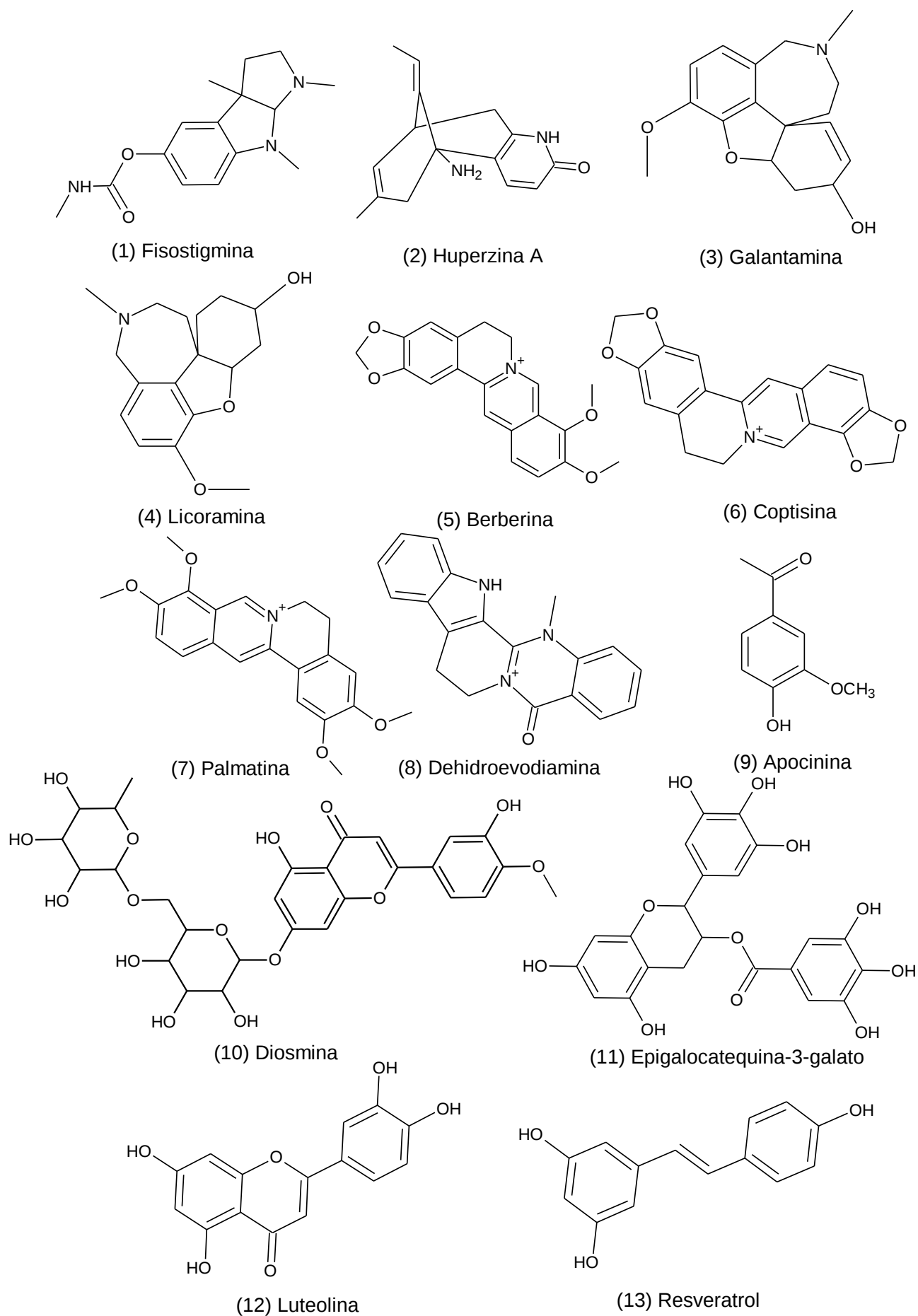
### 3.5 PLANEJAMENTO DE PROTÓTIPO HÍBRIDO

A hibridação molecular entre subunidades estruturais de diferentes moléculas bioativas, utilizada como uma das principais ferramentas de planejamento estrutural, tem levado à descoberta de inúmeros ligantes, com propriedades múltiplas (DIAS et al., 2015). Com a definição do farmacóforo e conhecendo o modo de interação fármaco-receptor, foi possível propor alterações na estrutura dos derivados de produtos naturais para se obter substâncias com atividade multialvo. Com isso, os farmacóforos dos inibidores da AChE (IAChE) e a estrutura da luteolina, inibidor da GSK-3 $\beta$  (IGSK-3 $\beta$ ), foram utilizados para o planejamento de uma série de híbridos IChE-IGSK-3 $\beta$  a partir do produto natural de cada classe que apresentou melhor resultado *in silico*.

### 4.1 DOCKING MOLECULAR

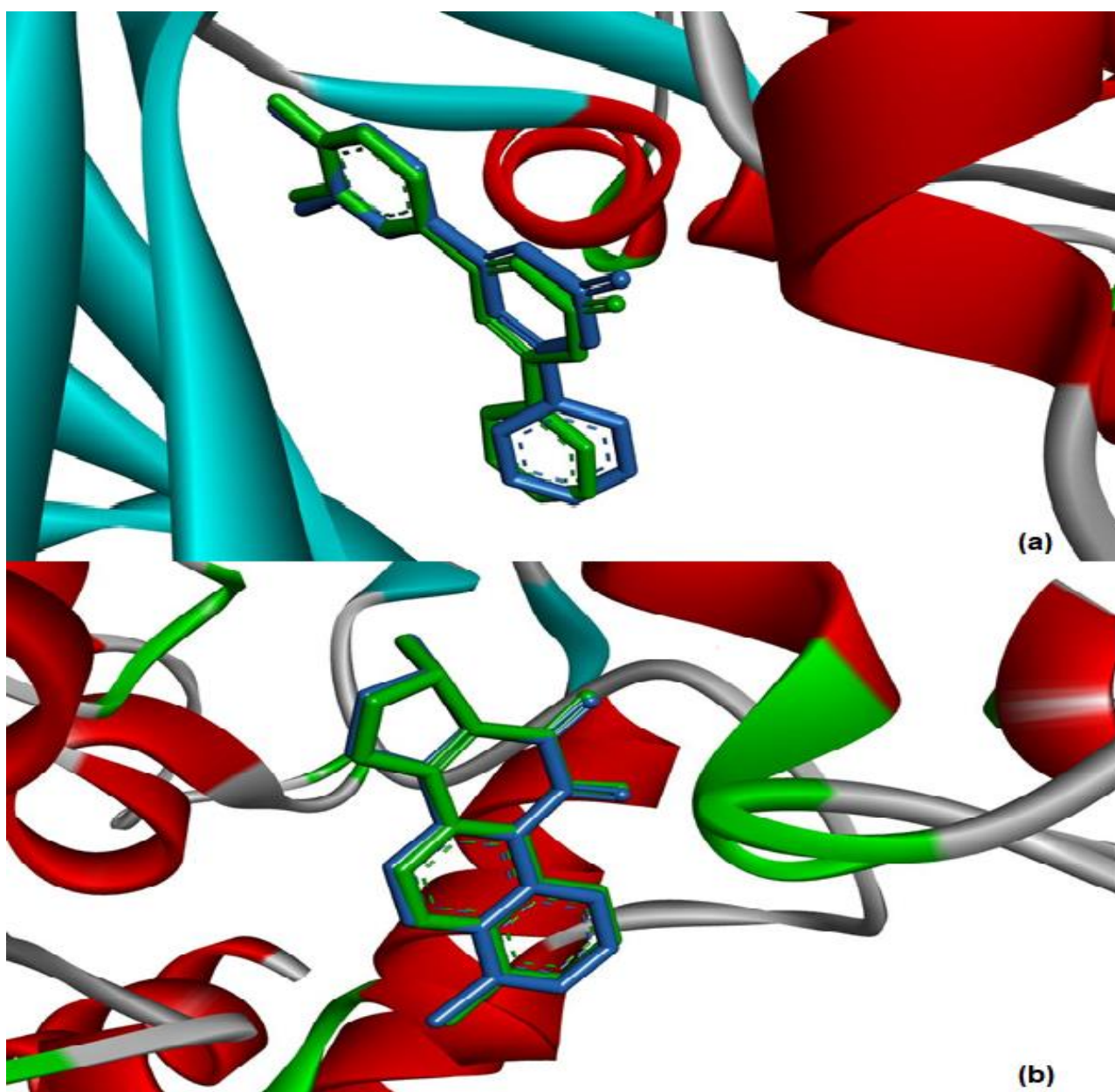
O programa GOLD 4.1 foi usado para investigar os modos de ligação entre os derivados de produtos naturais selecionados e gerar um conjunto de conformações para esses ligantes. Os derivados de produtos naturais estudados foram a Fisostigmina (1), Huperzina A (2), Galantamina (3), Licoramina (4), Berberina (5), Coptisina (6), Palmatina (7) e Dehidroevodiamina (8), Apocinina (9) Diosmina (10), Epigallocatequina-3-galato (11), Luteolina (12) e Resveratrol (13) (**Tabela 1**) (**Figura 5**). Para realizar o estudo de *Docking* das enzimas AChE (PDB ID: 4M0E) e GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 3Q3B) utilizou-se o programa GOLD 4.1 (VERDONK et al., 2003). Os átomos de hidrogênios polares foram adicionados e as moléculas de água e os inibidores foram retirados do receptor. Em seguida, foi realizada a preparação dos ligantes dihidrotanshinone I (AChE) (CHEUNG et al., 2013) e 4-(4-hidroxi-3-metilfenil)-6-fenilpirimidin-2(5H)-ona (GSK-3 $\beta$ ) (COFFMAN et al., 2011).

**Figura 5 - Estrutura dos derivados de produtos naturais selecionados da literatura**



Após este procedimento, foi realizada a simulação de *docking* entre as enzimas e o ligante experimental e, em seguida, realizou-se a validação do resultado através do cálculo do RMSD (Root-Mean-Square Deviation) (0,949 Å – Ångström para a GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 3Q3B) e 0,2704 Å para a AChE (PDB ID: 4M0E) entre o ligante experimental e a conformação de maior escore do ligante após o *docking* (**Figura 6**). Segundo Cole et al. (2005) a predição de *docking* com RMSD menor que 2Å para a conformação do ligante de maior escore é considerada bem sucedida.

**Figura 6** - (a) Reprodução da orientação cristalográfica (ligante experimental) (verde) no sítio de ligação GSK-3 $\beta$  e conformação com a maior escore do ligante após o Docking (azul). (b) Reprodução da orientação cristalográfica (ligante experimental) (verde) no sítio de ligação AChE e conformação com a maior escore do ligante após o Docking (azul).



**Fonte:** Discovery studio Visualizer 4.0

Para a análise de *docking* dos inibidores, o sítio de ligação foi definido com todos aminoácidos dentro de uma esfera localizada no sítio ativo, cujas coordenadas apresentaram os seguintes valores:  $x = -15,20$ ,  $y = -42,85$  e  $z = 25,07$  para AChE (PDB ID: 4M0E) e  $x = 38,75$ ,  $y = 7,98$  e  $z = 33,47$  para a GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 3Q3B).

Na simulação de *docking* com os derivados de produtos naturais (**Figura 7 e 8**), a **Fisostigmina** apresentou interação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Tyr72 e Tyr124 e interação hidrofóbica com Trp286 e Tyr341 da AChE e interação hidrofóbica com o aminoácido Lys85 da GSK-3 $\beta$ .

Ao analisar a simulação de *docking* com a AChE, a **Huperzina A** interagiu com os resíduos Tyr72, Asp74 (interação de hidrogênio) e Trp286 (hidrofóbica) e com o aminoácido Val135 da GSK-3 $\beta$  (interação de hidrogênio). Já a **Galantamina** interagiu com os aminoácidos Tyr72, Tyr124, Trp286 e Tyr341 da AChE por interações de hidrogênio e hidrofóbica e com o resíduo Val 135 da GSK-3 $\beta$  por interação de hidrogênio. A **Licoramina** interagiu com os resíduos de aminoácidos: Tyr72, Trp286 e Tyr341 (AChE) e Lys85 (GSK-3 $\beta$ ) por interações hidrofóbica e de hidrogênio.

Na simulação de *docking* da **Berberina** com a AChE, houve interação com apenas dois aminoácidos: Trp286 e Tyr341 através de uma interação de hidrogênio e interações hidrofóbicas, já com a GSK-3 $\beta$  a berberina interagiu com o resíduo Lys85 por interação hidrofóbica. A **Coptisina** interagiu com os seguintes resíduos da AChE: Tyr72, Trp286 (interação de hidrogênio) e Tyr341 (interação hidrofóbica) e com os resíduos de aminoácidos Lys85 e Asp133 da GSK-3 $\beta$  (interação de hidrogênio e hidrofóbica).

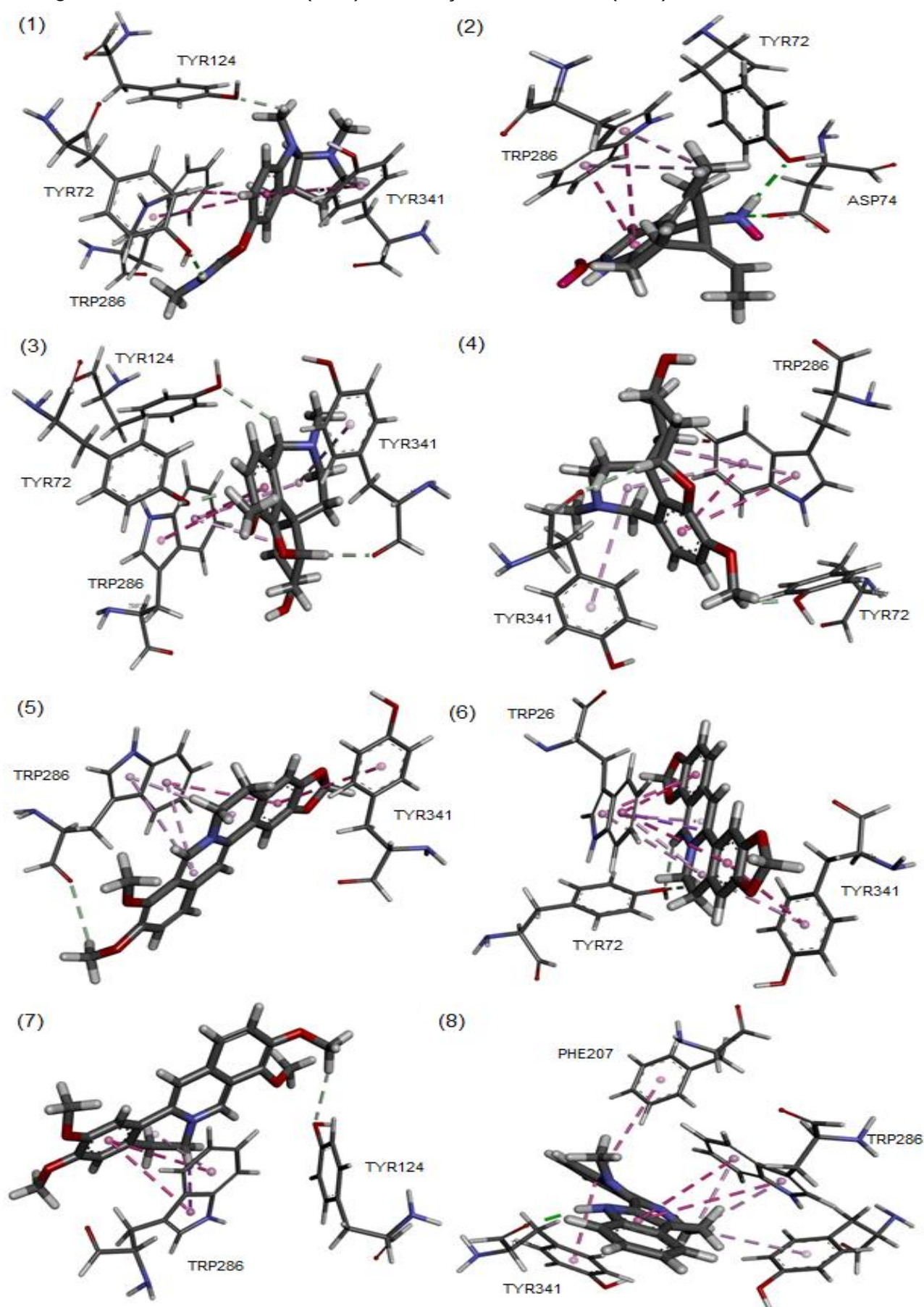
Na análise da interação da AChE com a **Palmatina**, os aminoácidos Tyr124 e Trp286 apresentaram interações de hidrogênio e hidrofóbica, respectivamente, e os resíduos Lys85 e Asp133 da GSK-3 $\beta$  tiveram interação hidrofóbica e de hidrogênio. A **Dehidroevodiamina** interagiu com os resíduos Tyr72, Trp286, Phe297 e Tyr341 da AChE e com os resíduos do sítio ativo da GSK-3 $\beta$ : Lys85, Asp133 e Val135 por interações de hidrogênio e hidrofóbica.

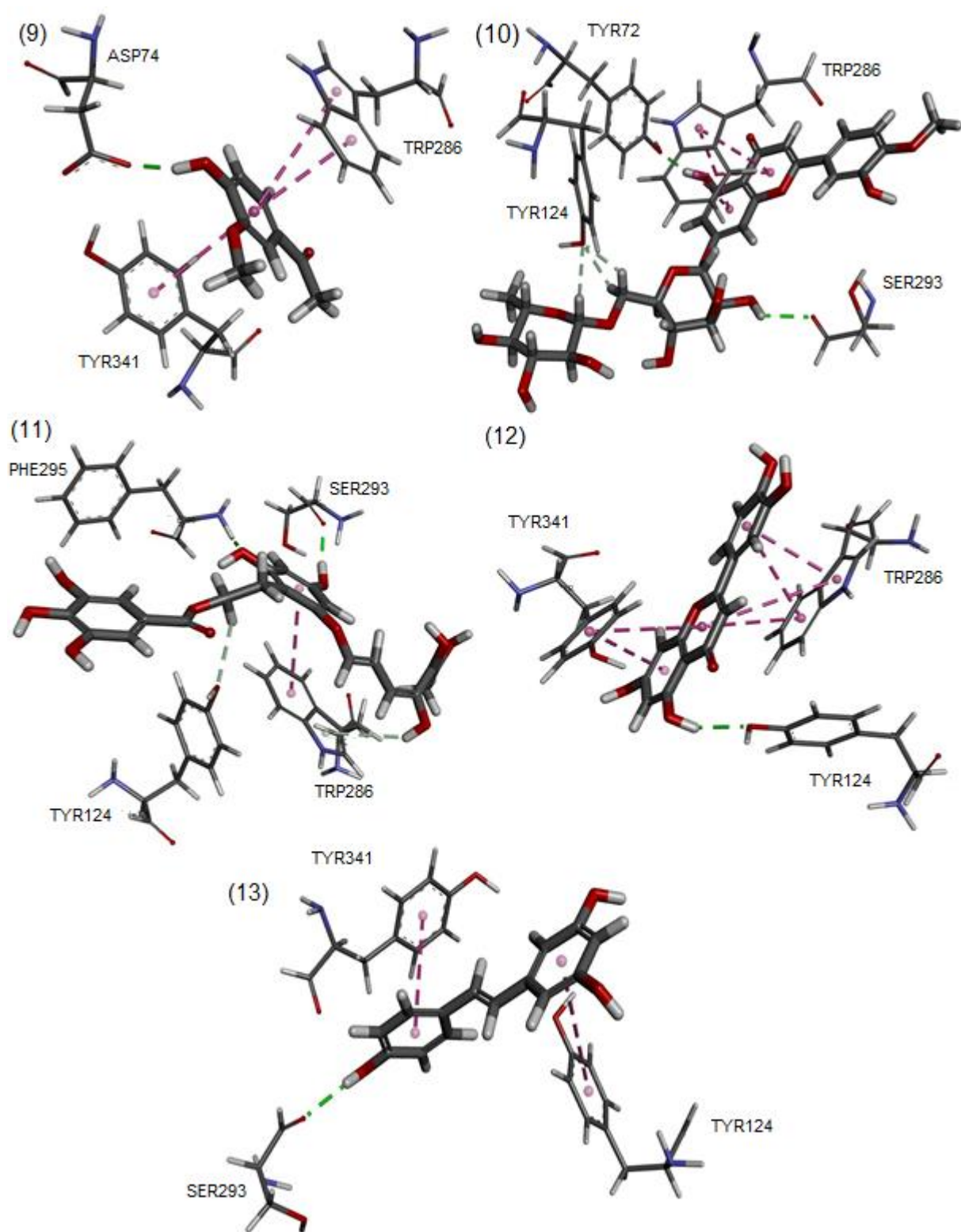
A **Apocinina** interagiu com os resíduos: Asp74, Trp286 e Tyr341 da AChE e com Lys85 da GSK-3 $\beta$  por interações hidrofóbicas de hidrogênio. Na simulação de *docking* da **Diosmina** com os aminoácidos Tyr72, Trp286, Ser293 e Tyr341 da AChE e com os resíduos Lys85 e Val135 também foram observadas interações de hidrogênio e hidrofóbica. Entretanto, os resíduos de aminoácidos Tyr124, Trp286, Ser293, Phe295 (AChE) e Asp133 e Val135 (GSK-3 $\beta$ ) apresentaram apenas interações de hidrogênio ao interagir com o **Epigallocatequina-3-galato**. Já o flavonoide, **Luteolina**, inibidor da GSK-

3 $\beta$  apresentou interações de hidrogênio e hidrofóbicas ao interagir com os aminoácidos Tyr124, Trp286, Tyr341 da AChE e Lys85 e Val135 da GSK-3 $\beta$ . O **Resveratrol** interagiu por interações hidrofóbica e de hidrogênio com os resíduos Tyr124, Ser293 e Tyr341 da AChE e apenas uma interação de hidrogênio com a Val135 da GSK-3 $\beta$ .

Ao analisar os valores de score ChemPLP (**Tabela 2 e 3**), o inibidor que apresentou maior afinidade pelas enzimas AChE e GSK-3 $\beta$  foi o composto **10** (96,43 e 83,87, respectivamente), seguido dos inibidores **11**, **7** e **12** (AChE), com valores de escore: 95,26; 78,91 e 78,11, respectivamente, e inibidores **11**, **6** e **12** (GSK-3 $\beta$ ), com valores de escore: 72,51; 64,22 e 62,67, respectivamente, todos híbridos da IChE-IGSK-3 $\beta$ .

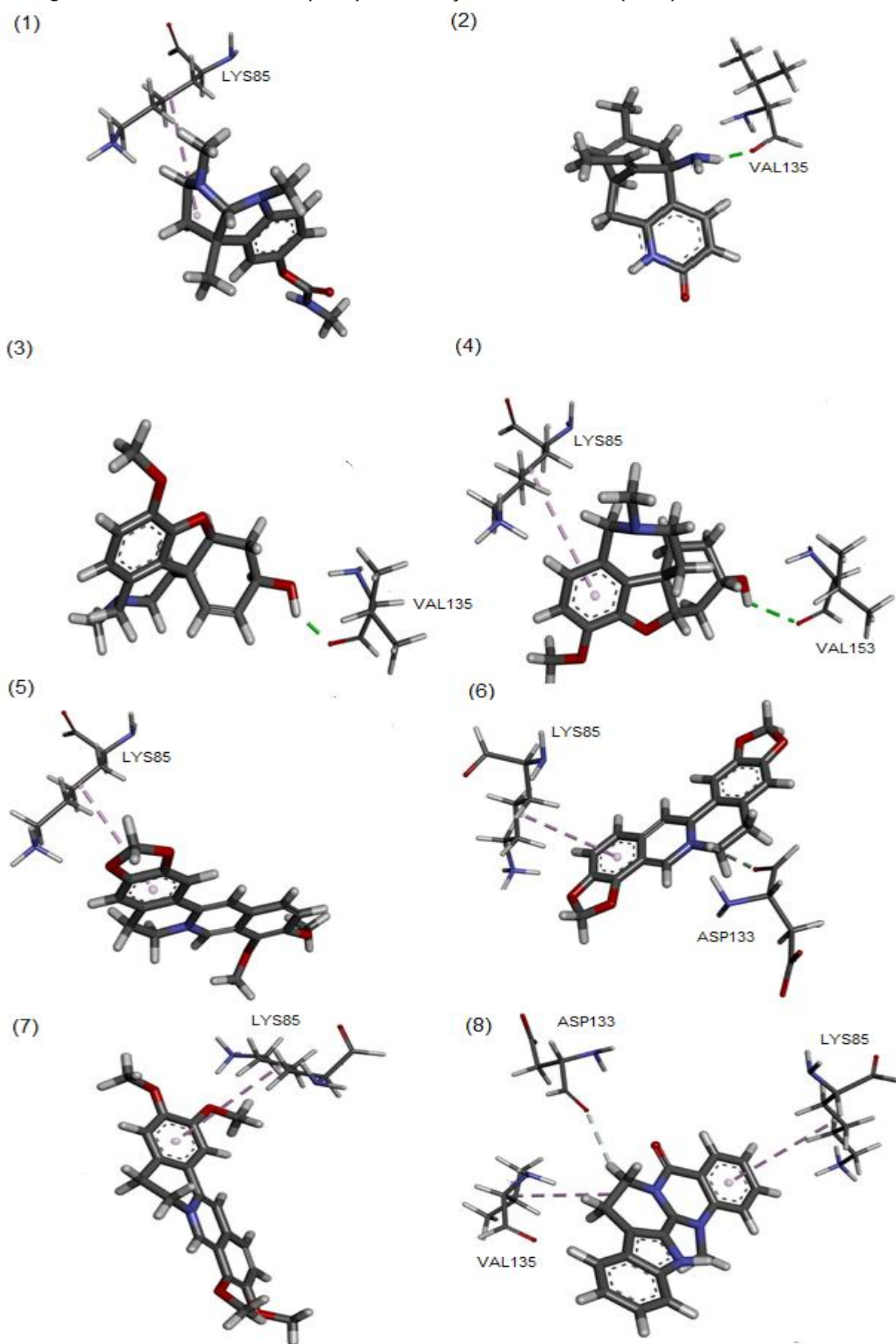
**Figura 7** - Resultado do *docking* dos derivados de produtos naturais e suas interações com o sítio de ligação da AChE: Ligação de hidrogênio convencional (verde), ligação de hidrogênio não convencional (azul) e interação hidrofóbica (rosa).



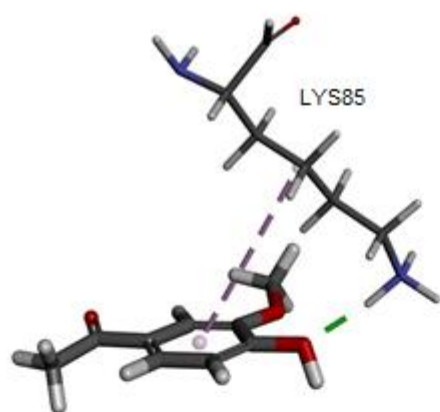


Fonte: Discovery studio Visualizer 4.0

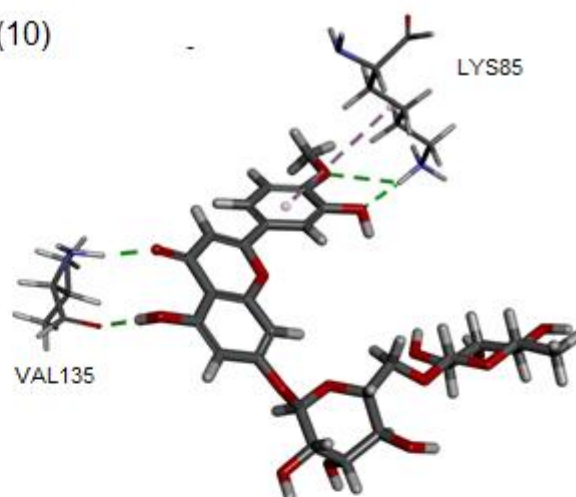
**Figura 8** - Resultado do *docking* dos derivados de produtos naturais e suas interações com o sítio de ligação da GSK-3 $\beta$ : Ligação de hidrogênio convencional (verde), ligação de hidrogênio não convencional (azul) e interação hidrofóbica (rosa).



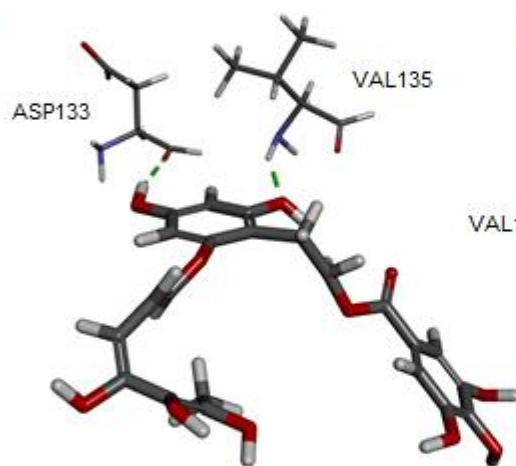
(9)



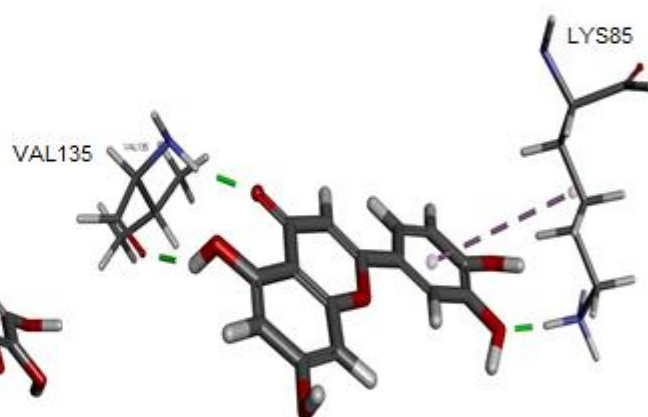
(10)



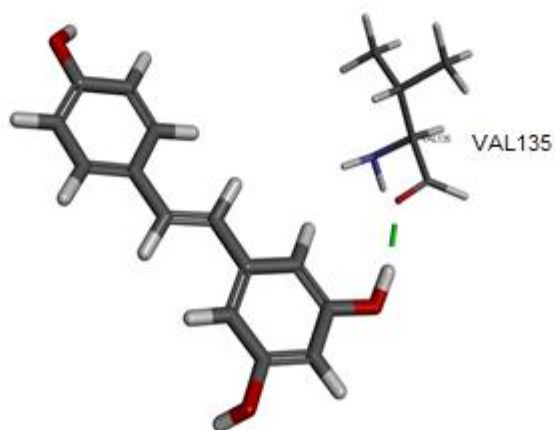
(11)



(12)



(13)



Fonte: Discovery Studio Visualizer 4.0

**Tabela 2** - Análise dos resultados de *Docking* Molecular gerada pelo programa Gold – AChE

| Molécula | Inibidor     | Aminoácido do sítio ativo | Átomos envolvidos (Inibidor-Aminoácido) | Tipo de Interação               | Distância (Å) | Score (ChemPLP) |
|----------|--------------|---------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|---------------|-----------------|
| 1        | Fisostigmina | Tyr 72                    | N15H29-O12                              | Interação de H convencional     | 2,10          | 59,05           |
|          |              | Tyr 124                   | C18H33-O12                              | Interação de H não convencional | 2,28          |                 |
|          |              | Trp286                    | Benzeno-Benzeno                         | Hidrofóbica                     | 3,97          |                 |
|          |              |                           | Benzeno-Diidro-1H Pirrol                | Hidrofóbica                     | 5,15          |                 |
|          |              |                           | C20-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 4,18          |                 |
|          |              | Tyr 341                   | Benzeno-Benzeno                         | Hidrofóbica                     | 4,45          |                 |
| 2        | Huperzina A  |                           | Pirrolidina-Benzeno                     | Hidrofóbica                     | 5,03          | 57,07           |
|          |              | Tyr 72                    | N4H21-O12                               | Interação de H convencional     | 2,08          |                 |
|          |              | Asp 74                    | N4H22-O2                                | Interação de H convencional     | 2,63          |                 |
|          |              |                           | Piridina-Benzeno                        | Hidrofóbica                     | 4,22          |                 |
|          |              | Trp 286                   | Piridina- Diidro-1H Pirrol              | Hidrofóbica                     | 5,70          |                 |
|          |              |                           | C18-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 3,80          |                 |
| 3        | Galantamina  |                           | C18- Diidro-1H Pirrol                   | Hidrofóbica                     | 5,0           | 54,08           |
|          |              | Tyr 72                    | C41H11-O12                              | Interação de H não convencional | 1,74          |                 |
|          |              | Tyr 124                   | C15H33-O12                              | Interação de H não convencional | 2,79          |                 |
|          |              |                           | Benzeno-Benzeno                         | Hidrofóbica                     | 4,05          |                 |
|          |              | Trp 286                   | Benzeno – Diidro-1H Pirrol              | Hidrofóbica                     | 5,02          |                 |
|          |              |                           | Anel Tetradiazepino-Benzeno             | Hidrofóbica                     | 4,91          |                 |
| 4        | Licoramina   |                           | Ciclo Hexeno-Benzeno                    | Hidrofóbica                     | 4,23          | 53,66           |
|          |              | Tyr 341                   | Anel Tetradiazepino-Benzeno             | Hidrofóbica                     | 4,68          |                 |
|          |              |                           | C8H22-O4                                | Interação de H não convencional | 2,18          |                 |
|          |              | Tyr 72                    | C21H43-O12                              | Interação de H não convencional | 1,93          |                 |
|          |              |                           | Benzeno-Benzeno                         | Hidrofóbica                     | 4,05          |                 |
|          |              |                           | Benzeno- Diidro-1H Pirrol               | Hidrofóbica                     | 5,02          |                 |
| 5        | Berberina    | Trp 286                   | Ciclohexano - Diidro-1H Pirrol          | Hidrofóbica                     | 5,48          | 77,86           |
|          |              |                           | Anel Tetradiazepino – benzeno           | Hidrofóbica                     | 4,75          |                 |
|          |              |                           | Ciclohexano-benzeno                     | Hidrofóbica                     | 4,05          |                 |
|          |              | Tyr 341                   | C8H22-O4                                | Interação de H não convencional | 2,41          |                 |
|          |              |                           | Anel Tetradiazepino – benzeno           | Hidrofóbica                     | 4,91          |                 |
|          |              | Trp 286                   | C25H41-O                                | Interação de H não convencional | 3,03          |                 |
| 5        | Berberina    |                           | Benzeno-Benzeno                         | Hidrofóbica                     | 4,49          | 77,86           |
|          |              |                           | Piperidina- Diidro-1H Pirrol            | Hidrofóbica                     | 4,18          |                 |
|          |              |                           | Ciclo-N-1,4-penteno-Diidro-1H Pirrol    | Hidrofóbica                     | 4,95          |                 |
|          |              |                           | Piperidina -Benzeno                     | Hidrofóbica                     | 3,47          |                 |
|          |              |                           | Ciclo-N-1,4-penteno-Benzeno             | Hidrofóbica                     | 4,41          |                 |

|    |                            |         |                                                 |                                                      |              |       |
|----|----------------------------|---------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------|-------|
| 6  | Coptisina                  | Tyr341  | Benzeno-Benzeno<br>C10H30-OH                    | Hidrofóbica<br>Interação de H<br>não<br>convencional | 4,74<br>2,86 | 77,14 |
|    |                            | Tyr 72  | C14H33-OH                                       | Interação de H<br>não<br>convencional                | 2,61         |       |
|    |                            | Trp 286 | C13-Benzeno                                     | Hidrofóbica                                          | 3,43         |       |
|    |                            |         | Benzeno-Benzeno                                 | Hidrofóbica                                          | 4,74         |       |
|    |                            |         | Benzeno-Benzeno                                 | Hidrofóbica                                          | 4,56         |       |
|    |                            |         | Benzeno- Diidro-1H<br>Pirrol                    | Hidrofóbica                                          | 4,32         |       |
|    |                            |         | Piperidina- Diidro-1H<br>Pirrol                 | Hidrofóbica                                          | 5,06         |       |
|    |                            |         | Ciclo-N-1,3-penteno-<br>Diidro-1H Pirrol        | Hidrofóbica                                          | 4,01         |       |
|    |                            |         | Piperidina-Benzeno                              | Hidrofóbica                                          | 4,06         |       |
|    |                            |         | Benzeno-Benzeno                                 | Hidrofóbica                                          | 4,22         |       |
|    |                            | Tyr 341 |                                                 |                                                      |              |       |
|    |                            | Tyr 124 | Piperidina-Benzeno<br>C26H47-O2                 | Hidrofóbica<br>Interação de H<br>não<br>convencional | 4,43<br>2,57 |       |
|    |                            |         | C13H8- Diidro-1H<br>Pirrol                      | Hidrofóbica                                          | 2,68         |       |
|    |                            | Trp 286 | Benzeno-Benzeno                                 | Hidrofóbica                                          | 4,53         |       |
|    |                            |         | Benzeno- Diidro-1H<br>Pirrol                    | Hidrofóbica                                          | 4,58         |       |
| 7  | Palmatina                  |         | Piperidina-Benzeno                              | Hidrofóbica                                          | 3,76         | 78,91 |
|    |                            | Tyr 72  | C9-Benzeno                                      | Hidrofóbica                                          | 4,69         |       |
|    |                            |         | Ciclo-N-buteno-<br>Piridina                     | Hidrofóbica                                          | 5,58         |       |
|    |                            | Trp286  | Pirrol-Benzeno                                  | Hidrofóbica                                          | 5,09         |       |
|    |                            | Phe 297 | C9- Diidro-1H Pirrol                            | Hidrofóbica                                          | 3,91         |       |
|    |                            |         | C9-Benzeno                                      | Hidrofóbica                                          | 3,71         |       |
| 8  | Dehidroevodiamina          |         | Benzeno-Benzeno<br>N9H28-O1                     | Hidrofóbica<br>Interação de H<br>convencional        | 5,85<br>1,98 | 75,55 |
|    |                            | Tyr 341 | Benzeno-Benzeno                                 | Hidrofóbica                                          | 4,29         |       |
|    |                            | Asp74   | O11H19-O8                                       | Interação de H<br>convencional                       | 1,74         |       |
|    |                            | Trp286  | Benzeno-Benzeno<br>Benzeno- Diidro-1H<br>Pirrol | Hidrofóbica<br>Hidrofóbica                           | 4,07<br>5,25 |       |
| 9  | Apocinina                  | Try341  | Benzeno-Benzeno                                 | Hidrofóbica                                          | 4,33         | 51,45 |
|    |                            | Tyr72   | O14H29-O2                                       | Interação de H<br>convencional                       | 1,59         |       |
|    |                            |         | C1H1-O2                                         | Interação de H<br>não<br>convencional                | 2,87         |       |
| 10 | Diosmina                   | Tyr124  | C6H6-O2                                         | Interação de H<br>não<br>convencional                | 2,15         | 96,43 |
|    |                            |         | C6H7-O2                                         | Interação de H<br>não<br>convencional                | 2,31         |       |
|    |                            |         | Benzeno-Benzeno                                 | Hidrofóbica                                          | 4,22         |       |
|    |                            | Trp286  | Pirano-Benzeno                                  | Hidrofóbica                                          | 4,87         |       |
|    |                            |         | Benzeno- Diidro-1H<br>Pirrol                    | Hidrofóbica                                          | 4,39         |       |
|    |                            |         | Pirano- Diidro-1H<br>Pirrol                     | Hidrofóbica                                          | 4,41         |       |
|    |                            | Ser293  | O11H26-O1                                       | Interação de H<br>convencional                       | 2,24         |       |
|    |                            | Try124  | C12H20-O12                                      | Interação de H<br>não<br>convencional                | 2,89         |       |
|    |                            | Trp286  | O31H49- Diidro-1H<br>Pirrol                     | Interação de H<br>não<br>convencional                | 3,25         |       |
|    |                            |         | Benzeno-Benzeno                                 | Hidrofóbica                                          | 4,46         |       |
| 11 | Epigallocatequina-3-galato | Ser293  | O8H37-O4                                        | Interação de H                                       | 1,80         | 95,26 |

|    |             |        |                                       |                                                |      |       |
|----|-------------|--------|---------------------------------------|------------------------------------------------|------|-------|
| 12 | Luteolina   | Phe295 | H36-N1H13                             | convencional<br>Interação de H<br>convencional | 2,01 | 78,11 |
|    |             | Tyr124 | O18H29-O12                            | Interação de H<br>convencional                 | 2,05 |       |
|    |             |        | 4H-Pirano-4-ona-<br>Benzeno           | Hidrofóbica                                    | 4,01 |       |
|    |             |        | Benzeno-Benzeno                       | Hidrofóbica                                    | 4,14 |       |
|    |             | Trp286 | 4H-Pirano-4-ona--<br>Diidro-1H Pirrol | Hidrofóbica                                    | 5,30 |       |
|    |             |        | Benzeno- Diidro-1H<br>Pirrol          | Hidrofóbica                                    | 3,88 |       |
|    |             |        | Benzeno-4H-Pirano-4-<br>ona           | Hidrofóbica                                    | 4,40 |       |
|    |             | Tyr341 | Benzeno-Benzeno                       | Hidrofóbica                                    | 4,21 |       |
|    |             | Tyr124 | Benzeno-Benzeno                       | Hidrofóbica                                    | 5,80 |       |
|    |             | Ser293 | O10H24-O4                             | Interação de H<br>convencional                 | 2,09 |       |
| 13 | Resveratrol | Tyr341 | Benzeno-Benzeno                       | Hidrofóbica                                    | 4,67 | 68,77 |

**Tabela 3** - Análise dos resultados de *Docking* Molecular gerada pelo programa Gold – GSK-3 $\beta$

| Molécula | Inibidor                   | Aminoácido do sítio ativo | Átomos envolvidos (Inibidor-Aminoácido) | Tipo de Interação               | Distância (Å) | Score (ChemPLP) |
|----------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|---------------|-----------------|
| 1        | Fisostigmina               | Lys85                     | Pirrolidina-C6                          | Hidrofóbica                     | 4,94          | 43,67           |
| 2        | Huperzina A                | Val135                    | N4H21-O4                                | Interação de H convencional     | 1,62          | 41,57           |
| 3        | Galantamina                | Val135                    | O20H39-O4                               | Interação de H convencional     | 1,83          | 51,25           |
| 4        | Licoramina                 | Lys85                     | Benzeno-C6                              | Hidrofóbica                     | 5,31          | 50,20           |
|          |                            | Val135                    | O20H41-O4                               | Interação de H convencional     | 2,32          |                 |
| 5        | Berberina                  | Lys85                     | Benzeno-C6                              | Hidrofóbica                     | 5,15          | 58,97           |
| 6        | Coptisina                  | Lys85                     | Benzeno-C6                              | Hidrofóbica                     | 4,84          | 64,22           |
|          |                            | Asp133                    | C10H29-O4                               | Interação de H não convencional | 2,67          |                 |
| 7        | Palmatina                  | Lys85                     | Benzeno-C6                              | Hidrofóbica                     | 5,43          | 60,12           |
|          |                            | Lys85                     | Benzeno-C6                              | Hidrofóbica                     | 5,23          |                 |
| 8        | Dehidroevodiamina          | Asp133                    | C11H31-O4                               | Interação de H não convencional | 2,68          | 57,84           |
|          |                            | Val135                    | Piperidina -C5                          | Hidrofóbica                     | 4,93          |                 |
| 9        | Apocinina                  | Lys85                     | Benzeno-C6                              | Hidrofóbica                     | 5,32          | 39,35           |
|          |                            |                           | O11H19-N9H24                            | Interação de H convencional     | 1,89          |                 |
|          |                            |                           | O7- N2H15                               | Interação de H convencional     | 2,84          | 83,87           |
|          |                            | Lys85                     | O1-N2H15                                | Interação de H convencional     | 2,07          |                 |
| 10       | Diosmina                   |                           | Benzeno-C4                              | Hidrofóbica                     | 4,41          |                 |
|          |                            | Val135                    | O14H29-O1                               | Interação de H convencional     | 1,64          |                 |
|          |                            |                           | O15-N1H1                                | Interação de H convencional     | 1,95          |                 |
| 11       | Epigallocatequina-3-galato | Asp133                    | O8H37-O4                                | Interação de H convencional     | 2,05          | 72,51           |
|          |                            | Val135                    | O7-N1H8                                 | Interação de H convencional     | 1,79          |                 |
|          |                            | Lys85                     | Benzeno-C6                              | Hidrofóbica                     | 5,13          | 62,67           |
|          |                            |                           | O21-N9H24                               | Interação de H convencional     | 1,59          |                 |
| 12       | Luteolina                  |                           | O18H29-O4                               | Interação de H convencional     | 1,93          |                 |
|          |                            | Val135                    | O19-N1H8                                | Interação de H convencional     | 1,98          |                 |
| 13       | Resveratrol                | Val135                    | C16H28-O4                               | Interação de H convencional     | 1,91          | 55,31           |

De acordo com Czeleń (2017), a força de interação de hidrogênio é classificada avaliando a distância entre o aceptor e o átomo de hidrogênio. Interações com distâncias menores que 1,6 Å são consideradas fortes, valores entre 1,6 Å e 2 Å são consideradas com força média e distâncias maiores que 2 Å são interações fracas. O *docking* da enzima GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 1Q41) com o ligante (3Z)-N-(3-hidroxi-2,2-dimetilpropil)-2-oxo-3-[(4-sulfamoiifenil)hidrazono]-5-indolinacarboxamida], utilizando o programa AutoDockVina, demonstrou interações de hidrogênio com os AA ácido aspártico Asp133, valina Val135, lisina Lys85, asparagina Asn186, treonina Thr138 e glutamina Gln185.

Na simulação de *docking* entre a GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 1J1B) e o inibidor N-(p-methoxy-phenyl)-isoindigo, observou-se interação hidrofóbica com as resíduos de AA Ile62, Val70, Ala83, Val110 e Leu188 e interações de hidrogênio com Asp133 (distância: 1,8 Å), Val135 (Distância: 2,8 Å) e Gln185 (Distância: 3,3 Å) (ZHAO et al., 2014). Utilizando o método LigandFit do Discovery Studio (BALAKRISHNAN; SANTHANA; NARESH, 2015) fizeram a simulação de *docking* da GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 1Q4L) e 8 inibidores, no qual foram observadas interações de hidrogênio com os resíduos Ile62, Asp133, Val135, Arg141, Lys183 e Gln185 e uma interação hidrofóbica com Arg141.

Em um estudo com derivados da Indirubina, observaram-se interações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos da enzima GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 1Q41) Asp133 e Val135 (CRISAN et al., 2013). Os inibidores 6-amino fenil piradazinona e o N-(6-oxo-5-fenil-1,6-dihidropiridazin-3-il) acetamida também realizam interação de hidrogênio com os aminoácidos Asp133 e Val135 da GSK-  $\beta$  (PDB ID: 1UV5) de acordo com Elagawany et al. (2013).

Para avaliar potenciais inibidores anti-Alzheimer, Ambure et al. (2014) realizaram o estudo de *docking* utilizando o programa MOE *docking*. Interações de hidrogênio e hidrofóbicas foram observadas entre a AChE (PDB ID 1B41) e a cumarina, furanocumarina, piranocumarina, piridocumarina e compostos não derivados da cumarina. Dentre os aminoácidos envolvidos estão: Asp74, Trp86, Gly121, Tyr124, Tyr133, Glu202, Ser203, Phe295, Arg296, Tyr337, Tyr 341 e His447.

Seong et al. (2017) realizaram o estudo de *docking*, utilizando o AutoDock 4.2 com a BACE-1 (PDB ID: 2WJO) e 5 inibidores: Três meroterpenos: ácido sargahidroquinóico, sargacromenol e ácido sargaquinóico e os inibidores conhecidos: 2-amino-{(1R)-1-ciclohexil-2-[(ciclohexilcarbonil) amino]etil}-6-fenoxiquinazolin-3-ium (inibidor complexado com a BACE-1) e o 5,7,40-trimetoxiflavona, no qual foi observado interações de hidrogênio e hidrofóbicas.

No *docking* da Tacrina com a AChE (PDB ID: 1ACJ), foi observado que este inibidor interage com os resíduos Phe330 e Trp184 por interação  $\pi$ - $\pi$  (subsítios aniônico periférico e aniônico, respectivamente) e através de duas interações de hidrogênio com moléculas de água. Enquanto que o composto 7-Amina-espiro[cromeno [4,3-b] quinolina-6,1'-ciclopentano] forma interação  $\pi$ - $\pi$  com Phe330, Tyr121 e Trp184 (subsítios aniônico periférico e aniônico, respectivamente) e uma interação de hidrogênio com a carbonila da His440 (BONACORSO et al., 2015).

As melhores conformações do triterpenoide disulfato dissódico 3 $\beta$ , 16 $\beta$  -di-hidroxi-20,29-di-hidrorolupano apresentaram interação hidrofóbica com os aminoácidos Gln74,

Trp279, Ile287, Phe290, Phe331 e Tyr334 e interação de hidrogênio com Gln74 (1,87Å) e Tyr121 (2,41 Å) da AChE (PDB ID: 2ACE) (CASTRO et al., 2014).

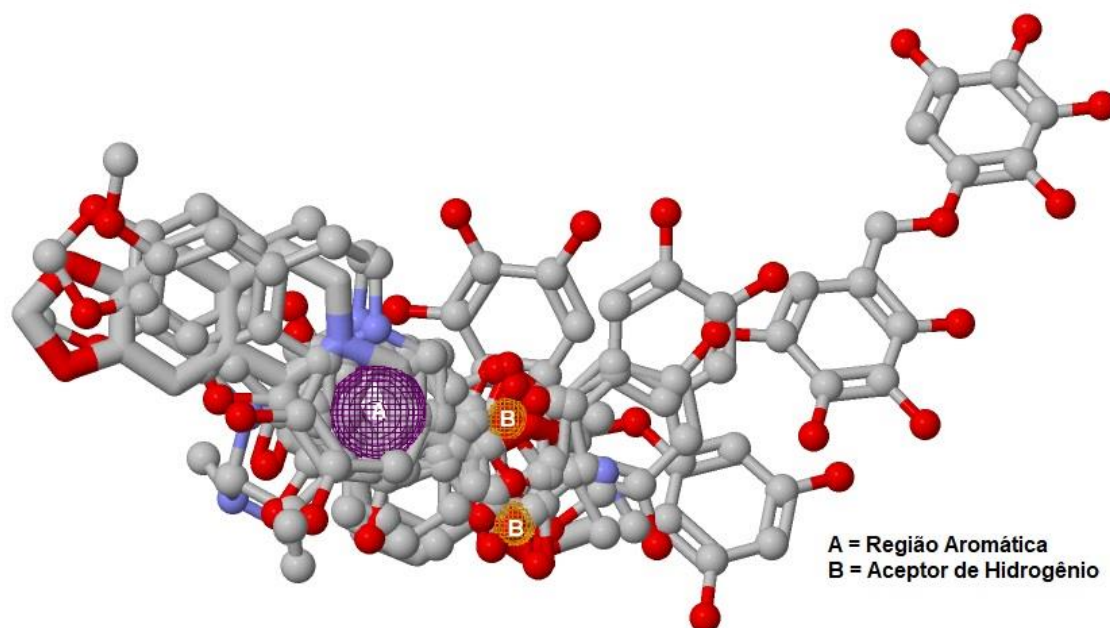
## 4.2 PREDIÇÃO DO PADRÃO FARMACOFÓRICO

Os derivados de produtos naturais foram analisados utilizando o webservice PharmaGist para a derivação do farmacóforo, sendo a fisostigmina utilizada como molécula pivô para gerar o melhor modelo farmacofórico, pois é o composto mais ativo ( $IC_{50} = 0,022 \mu M$ ). Na **figura 9**, observa-se o resultado com maior score (19,900), apresentando 8 moléculas alinhadas com três pontos farmacofóricos: uma região aromática (roxo) e dois aceptores de ligação de hidrogênio (laranja). Os compostos alinhados foram: **1, 5, 6, 7, 9, 10, 12 e 13**. A derivação do farmacóforo é utilizado para explicar e prever o efeito biológico de novos fármacos. O PharmaGist utiliza um algoritmo que identifica os melhores farmacofóros ao detectar múltiplos alinhamentos flexíveis do conjunto de treinamento (ligantes de entrada) e cada ligante desse conjunto serve como um ponto de referência para o alinhamento (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008; DROR et al., 2009).

Em estudo realizado por Ambure, Kar e Roy (2014) para avaliar potenciais inibidores da AChE, gerou-se um modelo farmacofórico utilizando o programa Discovery Studio 2.1, cuja a melhor hipótese apresentou quatro características farmacofóricas: 2 aceptores de ligação de hidrogênio, 1 região hidrofóbica alifática e 1 região hidrofóbica aromática.

Balakrishnan et al. (2015) utilizou o módulo HypoGen do Discovery Studio para gerar o modelo farmacofórico de um conjunto de 17 inibidores da GSK-3 $\beta$  e a melhor hipótese teve 3 características: 1 região hidrofóbica e 2 anéis aromáticos.

**Figura 9** - Alinhamento e modelo farmacofórico gerado para os derivados de produtos naturais com o servidor PharmaGist.



**Fonte:** ZincPharmer

Segundo Abbasi et al. (2012), em estudo da derivação do farmacóforo de inibidores da butilcolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer, as características observadas foram: doadores e aceptores de hidrogênio, grupos hidrofóbicos/aromáticos e regiões positivas. Nesse mesmo estudo, observa-se que a rivastigmina, um inibidor da AChE, apresentou 3 doadores de hidrogênio, 7 aceptores de hidrogênio, 2 grupamentos hidrofóbicos/aromáticos e 1 região positiva e o donepezil teve 1 doador de e 3 aceptores de hidrogênio, 2 grupos hidrofóbicos/aromáticos e 1 região positiva.

Em estudo com inibidores da GSK-3 $\beta$ , utilizando o web-servidor PharmaGist, o alinhamento de maior escore (28,169) apresentou 5 características: 3 grupos aromáticos, 1 doador de hidrogênio e 1 região positiva (AGRAWAL et al., 2013).

Pozzo et al. (2014) estudaram inibidores da proteína p53, que está envolvida no aumento de peptídeo  $\beta$ A, usando o software Phase 3.3 para a derivação do farmacóforo do composto 2-[4-(pirrolidin-1-il)fenil]imidazo[2,1-*b*][1,3]benzotiazol que gerou apenas uma hipótese farmacofórica com quatro anéis aromáticos, um acceptor de hidrogênio e um grupo hidrofóbico.

#### 4.3 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS (ADME) E TOXICOLÓGICAS (TOX)

Foi realizada a predição farmacocinética dos derivados de produtos naturais selecionados (**Tabela 4 e 5**) utilizando o módulo QikProp do software Schrödinger e o perfil de toxicidade usando o programa DEREK (**Tabela 6**). Ao predizer a absorção oral humana gastrointestinal, os compostos **10** e **11** têm baixa absorção e o **12** é moderadamente absorvido, o restante é altamente absorvido pelo intestino.

Na predição de permeabilidade de células Caco-2 na escala de Boehringer–Ingelheim, inibidores que apresentam valores menores que 5 nm/s, têm baixa permeabilidade nessas células e valores maiores que 100 nm/s têm alta permeabilidade (YAZDANIAN et al., 1998; IRVINE et al., 1999; STENBERG et al., 2001). Na análise da permeabilidade de células Caco-2 dos derivados de produtos naturais, com exceção de **10**, **11** e **12**, todos os compostos tiveram alta permeabilidade.

Candidatos a fármacos que apresentam permeabilidade em células MDCK menor que 25 nm/s tem baixa permeabilidade, enquanto que valores acima de 500 nm/s têm alta permeabilidade (IRVINE et al., 1999). Os inibidores **10**, **11** e **12** possuem baixa permeabilidade, os compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **13** mostraram permeabilidade moderada e os inibidores **5**, **6**, **7**, **8** e **9** tiveram alta permeabilidade.

O gene humano relacionado ao *Ether-a-go-go* (hERG) codifica canais de potássio dependente de voltagem responsáveis pela repolarização durante o potencial de ação do músculo cardíaco. O bloqueio desses canais pode levar a sérios problemas cardíacos (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2014). No estudo *in silico* realizado no software QikProp, valores de log IC<sub>50</sub> para inibição de hERG menores que -5 são considerados preocupantes (CAVALLI et al., 2002; IOAKIMIDIS et al., 2008), portanto, os compostos **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7** e **9** não bloqueiam canais hERG, já os compostos **1**, **8**, **10**, **11**, **12** e **13**, apresentam interação com o canal hERG.

**Tabela 4** – Propriedades de absorção dos derivados de produtos naturais.

|    | <b>Molécula</b>            | <b>Caco2</b><br><b>(nm/sec)</b> | <b>MDCK</b><br><b>(nm/sec)</b> | <b>AIH (%)</b> | <b>hERG</b> |
|----|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------|-------------|
| 1  | Fisostigmina               | 150,02                          | 77,91                          | 73,04          | -5,45       |
| 2  | Huperzina A                | 189,77                          | 90,80                          | 75,20          | -4,02       |
| 3  | Galantamina                | 779,32                          | 418,01                         | 90,43          | -4,49       |
| 4  | Licoramina                 | 789,35                          | 423,83                         | 90,52          | -4,07       |
| 5  | Berberina                  | 9627,14                         | 5719,98                        | 100            | -4,50       |
| 6  | Coptisina                  | 9769,31                         | 5811,33                        | 100            | -3,86       |
| 7  | Palmatina                  | 9845,76                         | 5860,50                        | 100            | -4,87       |
| 8  | Dehidroevodiamina          | 3144,11                         | 1706,42                        | 100            | -5,30       |
| 9  | Apocinina                  | 1046,61                         | 519,67                         | 89,74          | -3,59       |
| 10 | Diosmina                   | 2,65                            | 0,811                          | 0              | -6,69       |
| 11 | Epigallocatequina-3-galato | 1,73                            | 0,51                           | 9,79           | -6,39       |
| 12 | Luteolina                  | 39,49                           | 15,04                          | 60,94          | -5,04       |
| 13 | Resveratrol                | 269,04                          | 119,68                         | 81,81          | -5,25       |

$P_{Caco2}$  = Permeabilidade às células Caco 2;  $P_{MDCK}$  = Permeabilidade às MDCK; AIH = Absorção Intestinal Humana;  $P_{Pele}$  = Permeabilidade da Pele.

Fármacos com valores de logBB maiores que 0,3 são considerados como excelentes candidatos para atravessar a BHE e com valor menor que -1,0 não atravessam a BHE. Portanto, os compostos **2, 8, 9, 10, 11, 12** e **13** não atravessam a BHE, já os inibidores **1, 3, 4, 5, 6** e **7** podem atuar no SNC. Outro parâmetro que avalia a permeabilidade no SNC é a área de superfície polar (PSA), que segundo Pajouhesh e Lenz (2005), deve ser menor que 90 Å. No presente estudo, os inibidores **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9** e **13** tiveram valores entre 28,16 a 64,10 Å, ou seja, podem atravessar a BHE (**Tabela 5**), já os compostos **10, 11** e **12** não atravessam a BHE.

**Tabela 5** – Propriedade de penetração na BHE e área de superfície polar para os derivados de produtos naturais.

|    | Molécula                   | LogBB | PSA (Å) |
|----|----------------------------|-------|---------|
| 1  | Fisostigmina               | 0,73  | 56,46   |
| 2  | Huperzina A                | -0,03 | 64,10   |
| 3  | Galantamina                | 0,40  | 42,34   |
| 4  | Licoramina                 | 0,42  | 42,41   |
| 5  | Berberina                  | 0,43  | 31,40   |
| 6  | Coptisina                  | 0,55  | 37,46   |
| 7  | Palmatina                  | 0,32  | 28,16   |
| 8  | Dehidroevodiamina          | 0,09  | 43,26   |
| 9  | Apocinina                  | -0,46 | 56,42   |
| 10 | Diosmina                   | -4,83 | 234,84  |
| 11 | Epigallocatequina-3-galato | -4,67 | 208,73  |
| 12 | Luteolina                  | -1,97 | 123,06  |
| 13 | Resveratrol                | -1,29 | 68,27   |

BHE = Barreira Hematoencefálica; LPP = Ligação às Proteínas Plasmáticas

O DEREK indica se uma resposta tóxica específica pode ocorrer, não fornece uma estimativa quantitativa da predição. Ele detecta pontos toxicofóricos na estrutura, como mutagenicidade e carcinogenicidade (CARIELLO et al., 2002). Portanto, os inibidores foram analisados quanto à presença de grupos toxicofóricos e nenhum composto apresentou predição mutagênica e carcinogênica (**Tabela 6**).

De modo geral, os inibidores apresentaram bons resultados na predição farmacocinética e toxicológicas, com exceção do composto **10**, que não teve absorção no trato gastrointestinal, apresentou baixa permeabilidade em células Caco-2 e MDCK, bloqueou canais hERG e não demonstrou atividade no SNC.

**Tabela 6** – Análise das propriedades toxicológicas dos derivados de produtos naturais.

|    | <b>Molécula</b>            | <b>Carcinogenicidade</b> | <b>Mutagenicidade</b> |
|----|----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 1  | Fisostigmina               | Inativo                  | Inativo               |
| 2  | Huperzina A                | Inativo                  | Inativo               |
| 3  | Galantamina                | Inativo                  | Inativo               |
| 4  | Licoramina                 | Inativo                  | Inativo               |
| 5  | Berberina                  | Inativo                  | Inativo               |
| 6  | Coptisina                  | Inativo                  | Inativo               |
| 7  | Palmatina                  | Inativo                  | Inativo               |
| 8  | Dehidroevodiamina          | Inativo                  | Inativo               |
| 9  | Apocinina                  | Inativo                  | Inativo               |
| 10 | Diosmina                   | Inativo                  | Inativo               |
| 11 | Epigallocatequina-3-galato | Inativo                  | Inativo               |
| 12 | Luteolina                  | Inativo                  | Inativo               |
| 13 | Resveratrol                | Inativo                  | Inativo               |

Em estudo com inibidores de colinesterases e da monoamina oxidase, a maioria dos compostos atravessam a BHE, podendo ser ativos no SNC. Em relação as células MDCK, os compostos estudados apresentaram permeabilidade maior que 25, portanto, são considerados bons candidatos a fármaco. Além disso, observou-se uma média permeabilidade em células Caco-2. Esses inibidores também apresentaram fraca ligação a proteínas plasmáticas, podendo então atravessar barreiras e interagir com o alvo. Os candidatos a fármaco anti-Alzheimer também mostraram susceptibilidade aos canais de potássio hERG, que são responsáveis pela repolarização do músculo cardíaco após o início do potencial de ação. Além disso, algumas moléculas podem induzir carcinogenicidade em ratos. Após análise, concluiu-se que o composto N-((5-3-(1-Benzilpiperidin-4-il)propoxi)-1-metil-1H-indol-2-il)metil)prop-2-in-1-amina apresentou as melhores propriedade ADME nesse estudo (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2014).

Ao realizar um estudo com inibidores da BACE-1 (acilguanidina 7a, pioglitazona, rosiglitazona e ácido tartárico), Nisha et al. (2016) demonstraram que a acilguanidina 7a e a pioglitazona tiveram melhor absorção intestinal humana que o controle MK-8931. A Acilguanidina 7<sup>a</sup> também teve resultado significativo na absorção na BHE em relação ao controle (0,9 e 0,8, respectivamente). Quando realizada a análise toxicológica, todos os inibidores apresentaram predição negativa no Teste de Ames, ou seja, não são

mutagênicos e são não carcinogênicos. Apenas o ácido tartárico apresentou alta toxicidade aguda oral.

Fármacos que atravessam a BHE devem apresentar alto valor de TPSA (Total Polar Surface Area) (60 a 90 Å) (WAGER et al., 2010; MEANWELL, 2011). Ao estudar cromenotacrinas racêmicas Oset-Gasque et al. (2014), a maioria desses compostos tiveram altos valores de TPSA (96,06 Å<sup>2</sup>). Ademais, esses inibidores mostraram um perfil suficiente para atravessar a BHE, média permeabilidade em Caco-2 e alto percentual de absorção intestinal (%HIA).

Em estudo realizado, foram avaliados inibidores do receptor da metalotioneína III, uma família de proteína de baixo peso molecular conhecida como fator inibidor de crescimento, que está em pequena quantidade em pacientes com doenças neuronais como a DA. Foram estudados 156 compostos, sendo 41 apresentaram bom perfil ADME e apenas 7 moléculas apresentaram a propriedade de atravessar a BHE, sendo 3 desses inibidores tiveram interação com o alvo e mostraram absorção intestinal favorável e apresentaram ligação a proteínas plasmáticas maior que 95%. Além disso, esses compostos tiveram FPSA (Fast Polar Surface área) menor que 140 Å, ou seja, apresentam alta permeabilidade. Quanto ao perfil toxicológico, os inibidores não são hepatotóxicos e não inibem o CYP450 2D6, ademais, tiveram resultados dentro dos limites permitidos para as propriedades mutagênicas, carcinogênica, irritação ocular e irritação na pele (ROY; KUMAR; PROVAZNIK, 2014).

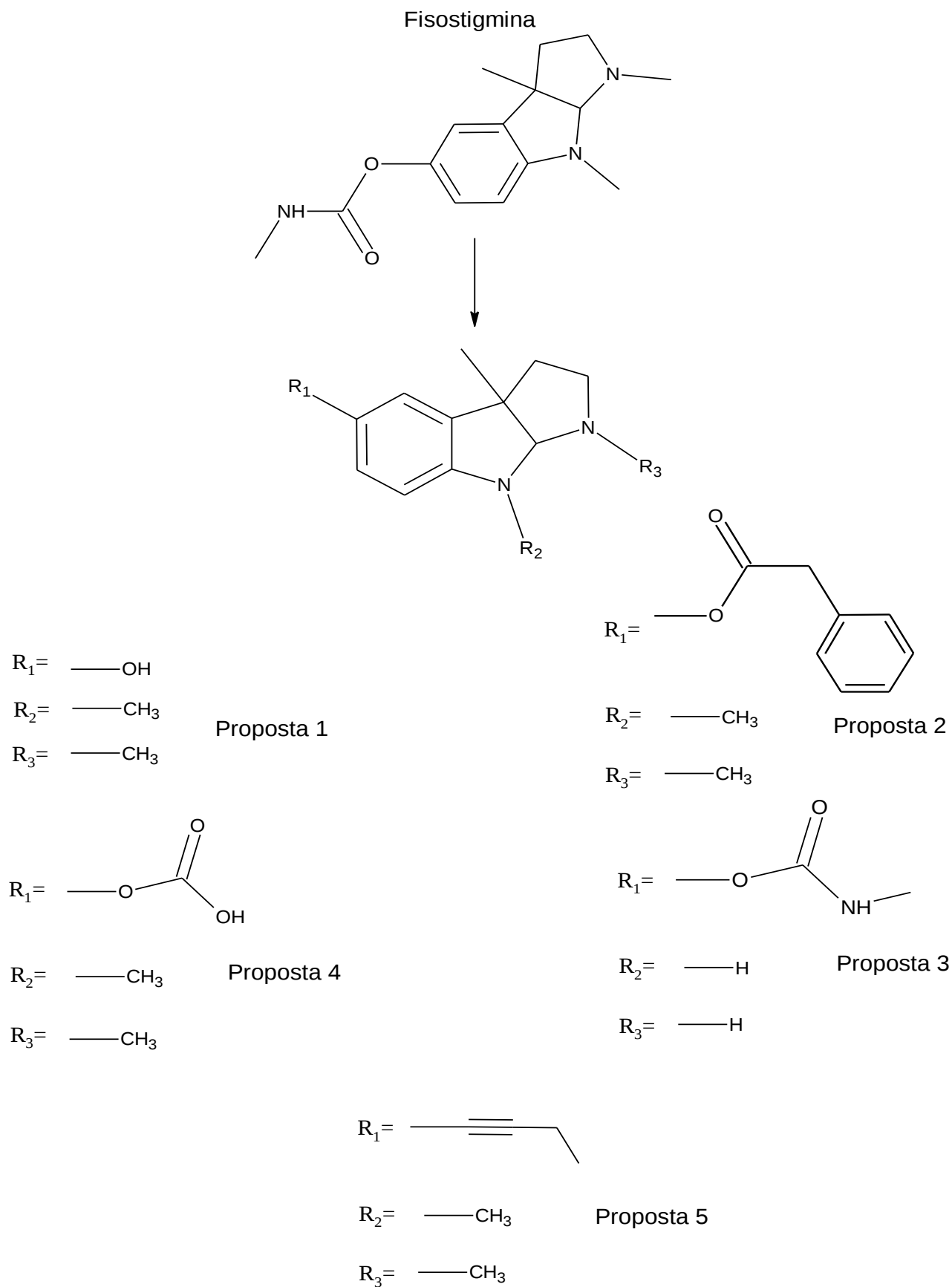
As propriedades ADME/Tox e físico-químicas de 89 inibidores da BACE-1 foram avaliadas, usando os softwares DEREK 10.0.2 e QikProp 3.2, em estudo realizado por Semighini (2014). Todas as moléculas tiveram boa absorção oral (com exceção de 8 que violaram as propriedades fármaco-similar). Na avaliação da atividade no SNC, 23 mostraram boa atividade e 30 tiveram atividade regular. Na predição toxicológica, nenhum inibidor teve resultado negativo. 50 mostraram resultado plausível para carcinogenicidade e 9 para mutagenicidade.

Em estudo com híbridos do donepezil, propargilamina e 8-hidroxiquinolina como fármacos multialvo contra a DA, apenas os híbridos  $\alpha$ -aminonitrilas apresentaram valores adequados para PSA (60-70 Å), ou seja, pode atuar no SNC. Ademais, esses candidatos a fármacos mostraram de média a alta absorção pela BHE. Os compostos apresentaram fraca ligação às proteínas plasmáticas, boa absorção intestinal, moderada permeabilidade em células MDCK e Caco-2. Nos resultados de toxicidade, os inibidores apresentaram cardiotoxicidade (bloqueio dos canais de potássio hERG), porém, não mostraram mutagenicidade e carcinogenicidade (WANG et al., 2014).

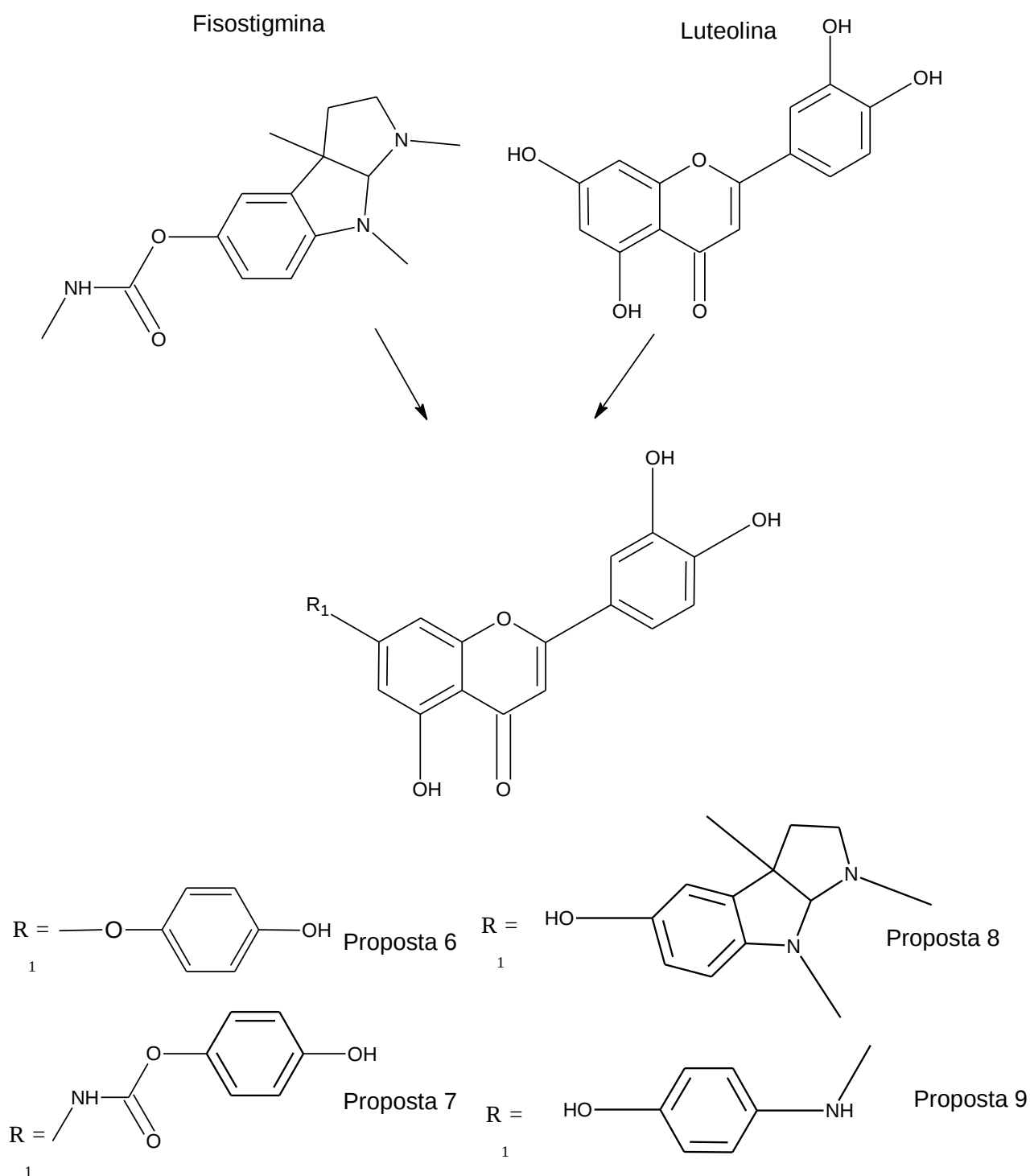
#### 4.4 MODIFICAÇÕES REALIZADAS

Após a análise dos resultados de *docking*, derivação do farmacóforo e predições farmacocinéticas e toxicológicas dos derivados de produtos naturais selecionados, a Fisostigmina foi escolhida, entre os IChE, como protótipo inibidor da AChE, devido sua alta atividade inibitória,  $IC_{50} = 0,022 \mu M$  (JACKISCH et al., 2009) e aos bons resultados *in silico* do presente estudo. A Luteolina foi eleita como protótipo inibidor da GSK-3 $\beta$ , pois é o único inibidor da GSK-3 $\beta$  entre os compostos estudados, com  $IC_{50} = 100 \mu M$ , segundo Pandurangan et al. (2013), para o planejamento dos novos candidatos a fármacos inibidores da AChE e para o desenvolvimento dos híbridos IChE-IGSK-3 $\beta$ . Nas figuras abaixo são demonstradas as modificações realizadas na molécula da Fisostigmina (**Figura 10**) para a preparação das propostas dos candidatos a fármacos anticolinesterásicos e nas moléculas da Fisostigmina e Luteolina para a preparação dos híbridos candidatos a fármacos multialvo IChE-IGSK-3 $\beta$  (**Figura 11**).

**Figura 10** - Modificações realizadas na Fisostigmina para a preparação dos candidatos a fármacos anticolinesterásicos



**Figura 11** - Modificações realizadas na Fisostigmina e na Luteolina para a preparação dos híbridos candidatos à fármacos multialvo para a AChE e GSK-3 $\beta$



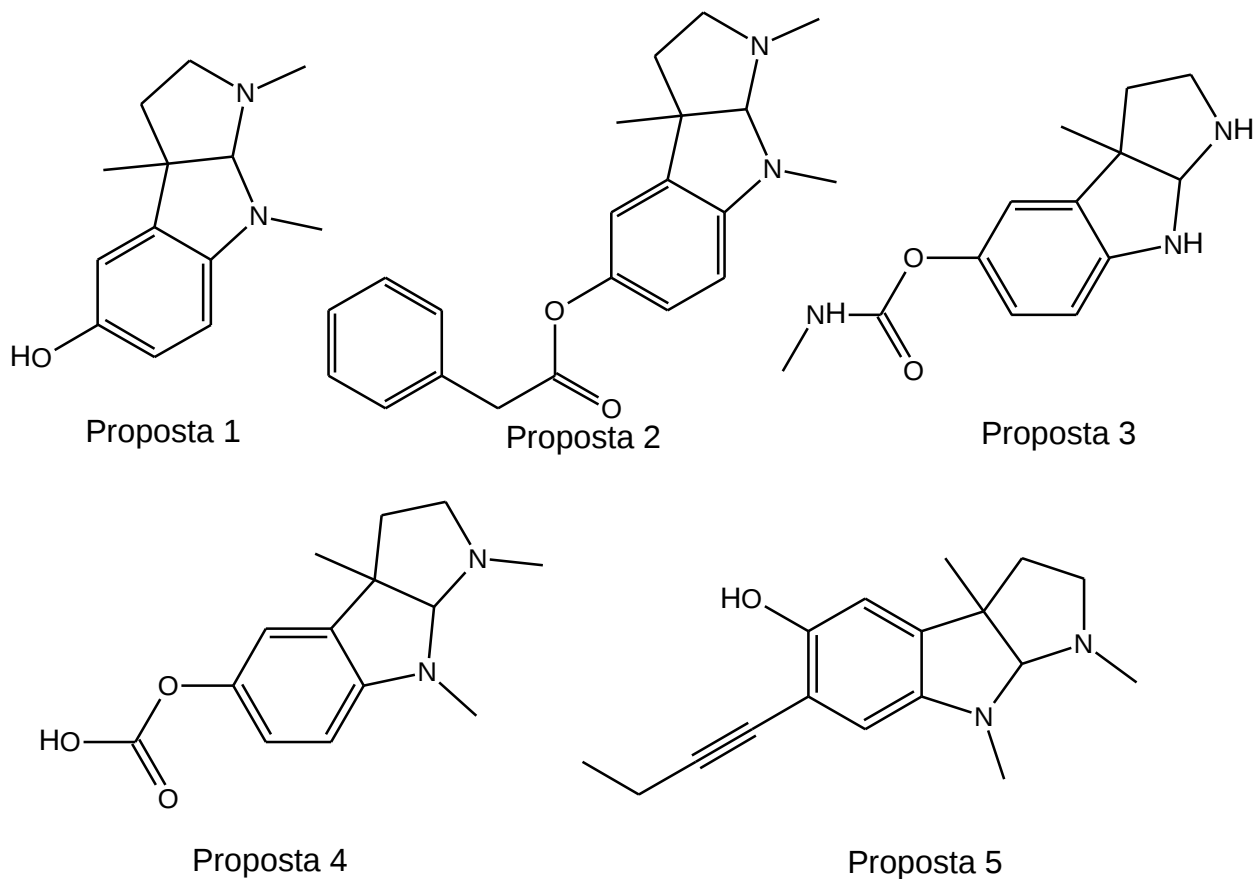
Fonte: ChemDraw® Ultra

#### 4.5 ESTUDO DE PREDIÇÃO DE ATIVIDADE DAS PROPOSTAS

Para propor novos candidatos a fármacos inibidores da AChE e da GSK-3 $\beta$ , foram utilizados como protótipos a Fisostigmina e a Luteolina. Foram feitas 5 propostas para

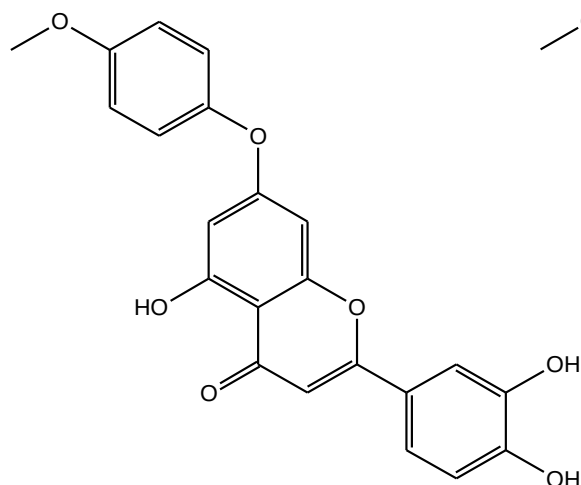
candidatos a fármacos anticolinesterásicos (**proposta 1, 2, 3, 4 e 5**) (**Figura 12**) e 4 híbridos como candidatos a fármacos multialvo para a AChE e GSK-3 $\beta$  (**proposta 6, 7, 8 e 9**) (**Figura 13**).

**Figura 12** - Propostas candidatas a fármacos anticolinesterásicos

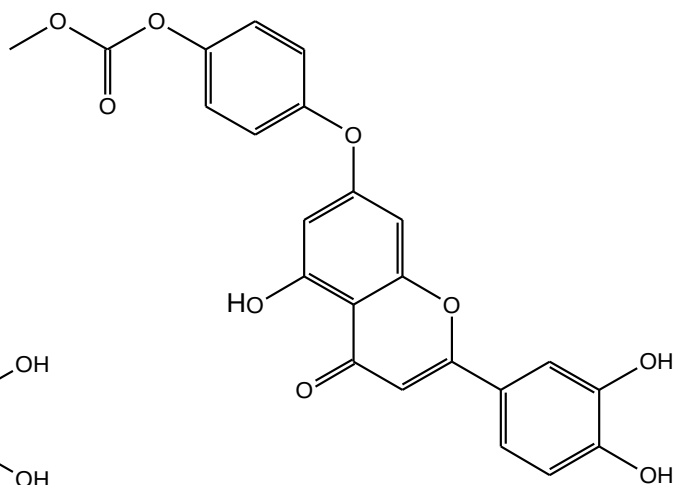


**Fonte:** ChemDraw® Ultra

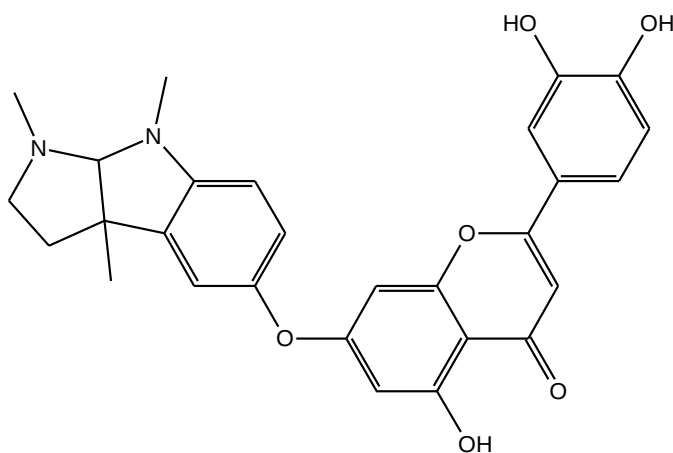
**Figura 13** - Propostas híbridas candidatas à fármacos multialvo para a AChE e GSK-3 $\beta$



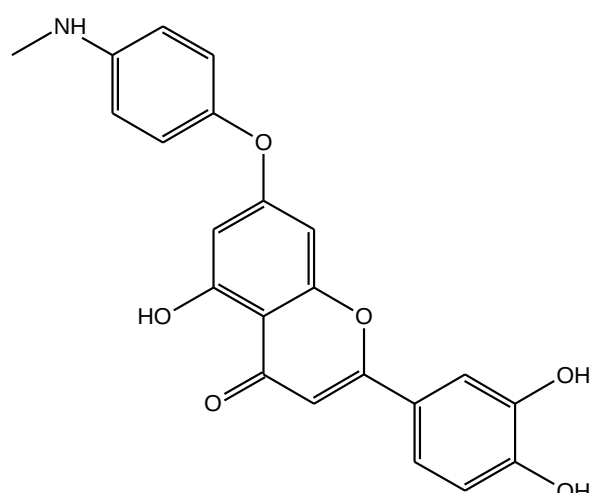
Proposta 6



Proposta 7



Proposta 8



Proposta 9

**Fonte:** ChemDraw® Ultra

A predição *in silico* de espectros de atividade de substâncias (do inglês, *prediction of activity spectra for substances*, PASS) prevê se um candidato a fármaco é ativo contra um alvo biológico com base nos métodos físico-químicos que utilizam vários algoritmos e comparações. As atividades biológicas são: efeitos farmacológicos e colaterais, mecanismo de ação, mutagenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e embriotoxicidade (FILIMONOV; POROIKOV, 1996; BRITO et al., 2001).

No resultado da predição da atividade biológica (**Tabela 7**), as atividades com o valor de  $P_a > P_i$  foram consideradas, onde  $P_a$  = Potencial de atividade e  $P_i$  = Potencial de inatividade e os valores variam de 0 a 1. A tabela a seguir mostra os valores para a Fisostigmina, Luteolina e para as 9 propostas de candidatos a inibidores da AChE e GSK-

3β. As nove propostas tiveram valores de  $P_a > P_i$ . A atividade anti-Alzheimer da Fisostigmina foi confirmada nesse estudo ( $P_a = 0,329$ ) e a Luteolina apresentou predição de atividade para a GSK-3α ( $P_a = 0,101$ ). As **propostas 1, 2, 5 e 8** ( $P_a = 0,368, 0,257, 0,188$  e  $0,249$ , respectivamente) apresentaram atividade anti-Alzheimer e as **propostas 6 e 9** mostraram atividade para GSK-3α ( $P_a = 0,043$  e  $0,041$ , respectivamente). O restante, possui atividade como antagonista da proteína precursora β-amiloide (**proposta 3 e 4**,  $P_a = 0,135$  e  $0,375$ , respectivamente) e inibidor da agregação β-amiloide (**proposta 7**,  $P_a = 0,153$ ). Logo, as propostas **1, 4 e 8** apresentaram os maiores valores de  $P_a$ .

**Tabela 7** - Predição da atividade biológica das propostas realizadas

| <b>Composto</b> | <b><math>P_a</math></b> | <b><math>P_i</math></b> | <b>Atividade</b>                      |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Fisostigmina    | 0,329                   | 0,052                   | Tratamento da doença de Alzheimer     |
| Luteolina       | 0,101                   | 0,015                   | Inibidor da GSK-3α                    |
| Proposta 1      | 0,368                   | 0,038                   | Anti-Alzheimer                        |
| Proposta 2      | 0,257                   | 0,090                   | Anti-Alzheimer                        |
| Proposta 3      | 0,135                   | 0,098                   | Antagonista da proteína precursora βA |
| Proposta 4      | 0,375                   | 0,012                   | Antagonista da proteína precursora βA |
| Proposta 5      | 0,188                   | 0,171                   | Anti-Alzheimer                        |
| Proposta 6      | 0,043                   | 0,036                   | Inibidor da GSK-3α                    |
| Proposta 7      | 0,153                   | 0,027                   | Inibidor da agregação βA              |
| Proposta 8      | 0,249                   | 0,097                   | Anti-Alzheimer                        |
| Proposta 9      | 0,041                   | 0,039                   | Inibidor da GSK-3α                    |

Segundo Lagunin et al. (2000), quando o valor de  $P_a$  é menor que 0,5, se torna improvável que a substância exiba atividade experimental, entretanto, se a presença desta for confirmada em experimentos a substância pode ser considerada uma nova entidade química.

A atividade biológica de um composto depende da sua estrutura, propriedades físico-químicas, da entidade biológica (espécie, gênero, idade, etc.), da dose e via de administração. Todo o complexo de atividades do composto causado na entidade biológica é chamado de espectro de atividade biológica da substância que é definido como a propriedade intrínseca de um composto dependendo unicamente de sua estrutura e características físico-químicas (ANZALI et al., 2001).

Em estudo realizado por Maridass (2008), o sesquiterpeno Poligodial, apresentou 114 tipos de atividades biológicas no PASS, como atividades antiviral ( $P_a = 0,341$  e  $P_i =$

0,099), anti-inflamatório ( $P_a = 0,465$  e  $P_i = 0,072$ ) e antineoplásica ( $P_a = 0,479$  e  $P_i = 0,068$ ).

O espectro de atividade biológica da substância dos principais fitoconstituintes da planta medicinal chinesa *Azadirachta indica*, foi avaliado por Pramely e Raj (2012). O nimbin, ninbidol, gedunin, salannin, azadirachtin e azadirona mostraram atividades antineoplásica ( $P_a = 0,639$  e  $P_i = 0,036$ ), antagonista da interleucina 5 ( $P_a = 0,362$  e  $P_i = 0,078$ ), antagonista do óxido nítrico ( $P_a = 0,503$  e  $P_i = 0,009$ ), inibidor de fosfatases ( $P_a = 0,820$  e  $P_i = 0,016$ ), imunossupressor ( $P_a = 0,651$  e  $P_i = 0,017$ ) e anti-inflamatório ( $P_a = 0,808$  e  $P_i = 0,009$ ), respectivamente.

#### 4.6 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS (ADME) E TOXICOLÓGICAS (TOX) DAS PROPOSTAS

Foi realizada a predição farmacocinética das propostas (**Tabela 8 e 9**) utilizando o módulo QikProp do software Schrödinger e o perfil de toxicidade usando o programa DEREK. Ao predizer a absorção oral humana gastrointestinal, as **propostas 3, 4, 7 e 8** são moderadamente absorvidas, o restante é altamente absorvido.

Na predição de permeabilidade de células Caco-2 dos compostos propostos, os candidatos a inibidores de AChE **3, 4, 7 e 8** apresentaram média permeabilidade nessas células, a proposta **9** teve permeabilidade moderada e as **propostas 1, 2, 5 e 6** tiveram alta permeabilidade.

As **propostas 4, 7 e 8** apresentaram baixa permeabilidade em células MDCK, entretanto, as **propostas 1, 2, 3, 5, 6 e 9** apresentaram permeabilidade moderada. Em relação a inibição dos canais hERG, somente as **propostas 1 e 4** não bloqueia esses canais, o restante tem interação com o canal hERG.

**Tabela 8** – Propriedades de absorção das propostas.

| <b>Molécula</b> | <b>Caco2<br/>(nm/sec)</b> | <b>MDCK<br/>(nm/sec)</b> | <b>AIH<br/>(%)</b> | <b>hERG</b> |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|--------------------|-------------|
| Fisostigmina    | 150,02                    | 77,91                    | 73,04              | -5,45       |
| Luteolina       | 39,49                     | 15,04                    | 60,94              | -5,04       |
| Proposta 1      | 171,25                    | 89,89                    | 73,87              | -4,86       |
| Proposta 2      | 200,14                    | 106,40                   | 82,09              | -5,48       |
| Proposta 3      | 65,26                     | 31,69                    | 60,88              | -5,06       |
| Proposta 4      | 13,13                     | 7,12                     | 42,56              | -3,12       |
| Proposta 5      | 200,73                    | 106,74                   | 82,91              | -5,86       |
| Proposta 6      | 151,02                    | 64,12                    | 84,78              | -6,37       |
| Proposta 7      | 21,89                     | 7,95                     | 64,74              | -6,96       |
| Proposta 8      | 9,39                      | 3,90                     | 61,73              | -7,96       |
| Proposta 9      | 89,21                     | 36,29                    | 78,89              | -6,54       |

Ao avaliar a permeabilidade na BHE, os candidatos a inibidores da AChE, **proposta 1, 2, 3, 4 e 5** atravessam esta barreira, portanto, os híbridos AChE-GSK-3 $\beta$  (**proposta 6, 7, 8, e 9**) não atuam no SNC. Para avaliar a ação no SNC também é usado a PSA. As **propostas 1, 2, 3, 4 e 5** apresentaram valores abaixo de 90Å, ou seja, podem atravessar a BHE, porém, as **propostas 6, 7, 8 e 9** não são permeáveis no SNC (**Tabela 9**).

**Tabela 9** – Propriedade de penetração na BHE e área de superfície polar para as propostas.

| <b>Molécula</b> | <b>LogBB</b> | <b>PSA</b> |
|-----------------|--------------|------------|
| Fisostigmina    | 0,73         | 56,46      |
| Luteolina       | -1,97        | 123,06     |
| Proposta 1      | 0,83         | 30,56      |
| Proposta 2      | 0,76         | 43,56      |
| Proposta 3      | 0,45         | 78,89      |
| Proposta 4      | 0,37         | 67,84      |
| Proposta 5      | 0,70         | 29,62      |
| Proposta 6      | -1,75        | 115,25     |
| Proposta 7      | -2,94        | 154,77     |
| Proposta 8      | -1,02        | 110,65     |
| Proposta 9      | -2,06        | 120,05     |

BHE = Barreira Hematoencefálica; LPP = Ligação às Proteínas Plasmáticas.

Na avaliação das propriedades toxicológicas nenhum composto apresentou predição mutagênica e carcinogênica de acordo com a **Tabela 10**.

**Tabela 10** – Análise das propriedades toxicológicas das propostas.

| <b>Molécula</b> | <b>Carcinogenicidade</b> | <b>Mutagenicidade</b> |
|-----------------|--------------------------|-----------------------|
| Fisostigmina    | Inativo                  | Inativo               |
| Luteolina       | Inativo                  | Inativo               |
| Proposta 1      | Inativo                  | Inativo               |
| Proposta 2      | Inativo                  | Inativo               |
| Proposta 3      | Inativo                  | Inativo               |
| Proposta 4      | Inativo                  | Inativo               |
| Proposta 5      | Inativo                  | Inativo               |
| Proposta 6      | Inativo                  | Inativo               |
| Proposta 7      | Inativo                  | Inativo               |
| Proposta 8      | Inativo                  | Inativo               |
| Proposta 9      | Inativo                  | Inativo               |

Portanto, de acordo com os resultados acima, os candidatos a fármacos IACHÉ, **propostas 1, 2 e 5**, obtiveram os melhores resultados nas predições farmacocinéticas e toxicológicas.

Foi realizada por Fernandes et al. (2017) a predição farmacocinética do análogo de sulfonilidrazonas sintetizado (E)-N0-(4-Hidroxi-3-metoxibenzilideno)-4-metoxibenzenesulfonohidrazona. Neste estudo, verificou-se que este inibidor apresenta boa permeabilidade no SNC e absorção no TGI, além de interagir com a região PAS da AChE de forma similar ao Donepezil. Segundo Abbasi et al. (2014), sulfonamidas derivadas do 1-amino-2-feniletano foram sintetizadas e avaliadas para a atividade anti-colinesterásica (AChE e BChE). Os resultados indicaram que esses compostos são inibidores de ambas as enzimas testadas.

Em estudo realizado por Monte et al. (2005) uma série de candidatos a fármacos híbridos do donepezil-tacrina, observou-se que o composto 2-[8-(acridin-9-ilamino) octil] isoindolina-1,3-diona inibe, simultaneamente, a AChE em dois sítios de ligação, o PAS e o sítio catalítico, mostrando então duplo mecanismo de ação no tratamento da DA.

Além de inibir a AChE, o composto 2-(5-(4-Fluorobenzilamino)pentil)isoindoline-1,3-diona também inibiu a agregação  $\beta$ A, 65,96% na dose de 10 mM, e efeito neuroprotetor contra o peptídeo  $\beta$ A nas concentrações de 1  $\mu$ M e 3  $\mu$ M (84,55% e 76,25%,

respectivamente), tornando-se um candidato a fármaco multialvo. Além disso, nas concentrações estudadas, esse inibidor não apresentou toxicidade (GUZIOR et al., 2015).

#### 4.7 DOCKING MOLECULAR DAS PROPOSTAS

Para a análise de *docking* das propostas realizadas, o sítio de ligação foi definido com todos aminoácidos dentro de uma esfera localizada no sítio ativo, cujas coordenadas apresentaram os seguintes valores:  $x = -15,20$ ,  $y = -42,85$  e  $z = 25,07$  para AChE (PDB ID: 4M0E) e  $x = 38,75$ ,  $y = 7,98$  e  $z = 33,47$  para a GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 3Q3B).

Na simulação de *docking* das propostas (**Figura 14 e 15**), a **proposta 1** apresentou interação de hidrogênio não convencional com o aminoácido Tyr124, interação de hidrogênio convencional com Ser293 e interação hidrofóbica com os resíduos Trp286, Phe297 e Tyr341 da AChE e interação hidrofóbica com o aminoácido Lys85 e interação de hidrogênio com Asp133 e Val135 da GSK-3 $\beta$ . Observou-se que a **proposta 2** apresentou interação hidrofóbica com os aminoácidos Trp286, Phe297 e Tyr341, além de duas interações de hidrogênio não convencional com Asp74 e Tyr124 da AChE e apenas uma interação de hidrogênio convencional com o resíduo Val135 da GSK-3  $\beta$ .

Ademais, a **proposta 3** interagiu com o resíduo da AChE, Tyr124, através de ligação de hidrogênio e com os resíduos Trp286 e Ph297 através de interação hidrofóbica. Já com a GSK-3 $\beta$  formou uma interação de hidrogênio convencional e outra não convencional com Val135. Com os resíduos de aminoácidos da AChE Tyr72, Trp286 e Tyr341 foram observadas interações hidrofóbicas na **proposta 4** e interações de hidrogênio não convencionais com Ser293 e Tyr 341. Com a enzima GSK-3 $\beta$ , observou-se uma interação de hidrofóbica com Asp133.

A **proposta 5** apresentou interação hidrofóbica com os resíduos Tyr72, Trp286, Phe297 e Tyr341 da AChE e com o aminoácido Lys85 da GSK-3 $\beta$ , além disso, observam-se interações hidrofóbicas com os aminoácidos Tyr72, Tyr124, Trp286, Phe297 e interações de hidrogênio com Asp74, Ser293 e Tyr341 da AChE e uma interação hidrofóbica e interações de hidrogênio com o aminoácido Lys85 da GSK-3 $\beta$ . Foi observado interação hidrofóbica com os resíduos de aminoácidos Trp286 e Tyr341 da AChE e Lys85 da GSK-3 $\beta$ , da **proposta 6**, e interação de hidrogênio com os resíduos Asp74 e Ser293 da AChE e Lys 85 e Val135 da GSK-3 $\beta$ .

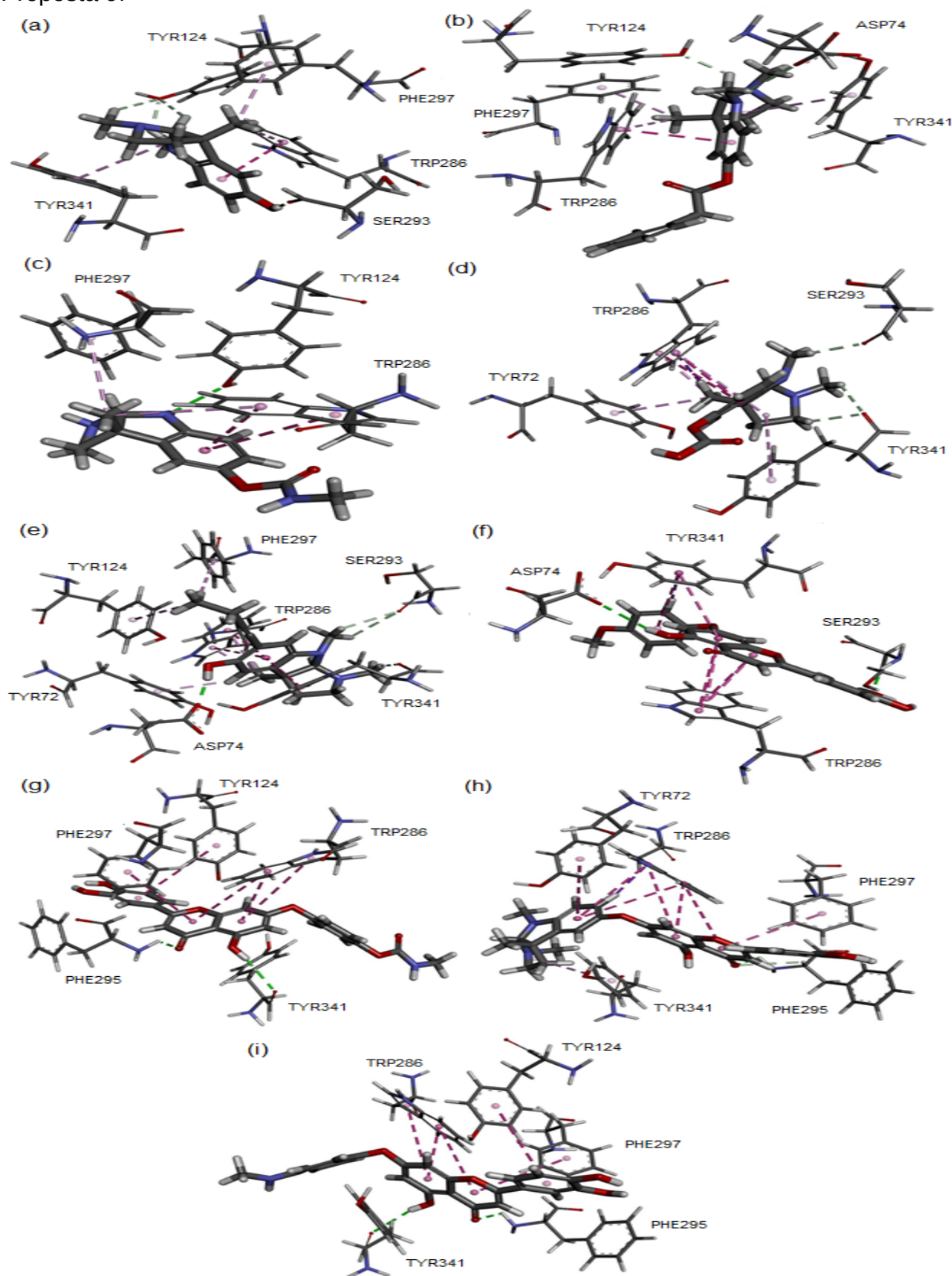
Observou-se interações hidrofóbicas com os aminoácidos Tyr124, Trp286 e Phe297 da AChE e Lys85 da GSK-3 $\beta$  da **proposta 7** e interação de hidrogênio com os resíduos Phe295 e Tyr341 da AChE e resíduos Lys 85 e Val135 da GSK-3 $\beta$ . A **proposta 8**

apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos Tyr72, Trp286, Phe297 e Tyr341 da AChE e Lys85 da GSK-3 $\beta$  e interação de hidrogênio com Phe295 da AChE e Lys 85 e Val135 da GSK-3 $\beta$ . Já a **proposta 9** demonstrou interações hidrofóbicas com os aminoácidos Tyr124, Trp286 e Phe297 da AChE e Lys85 da GSK-3 $\beta$  e interações de hidrogênio com Phe295 e Tyr341 da AChE e Lys 85, Asp133 e Val135 da GSK-3 $\beta$ .

Na análise dos valores de score ChemPLP (**Tabela 11 e 12**), as propostas que apresentaram maior afinidade pelas enzimas AChE e GSK-3 $\beta$  foram: **propostas 6, 7 e 9**, valores de escore: 91,40; 89,49 e 88,00 (AChE), respectivamente, e **propostas 6, 7 e 9** (GSK-3 $\beta$ ), com valores de escore: 70,42; 69,25 e 68,75, respectivamente, todos híbridos da IChE-IGSK-3 $\beta$ . (Correto)

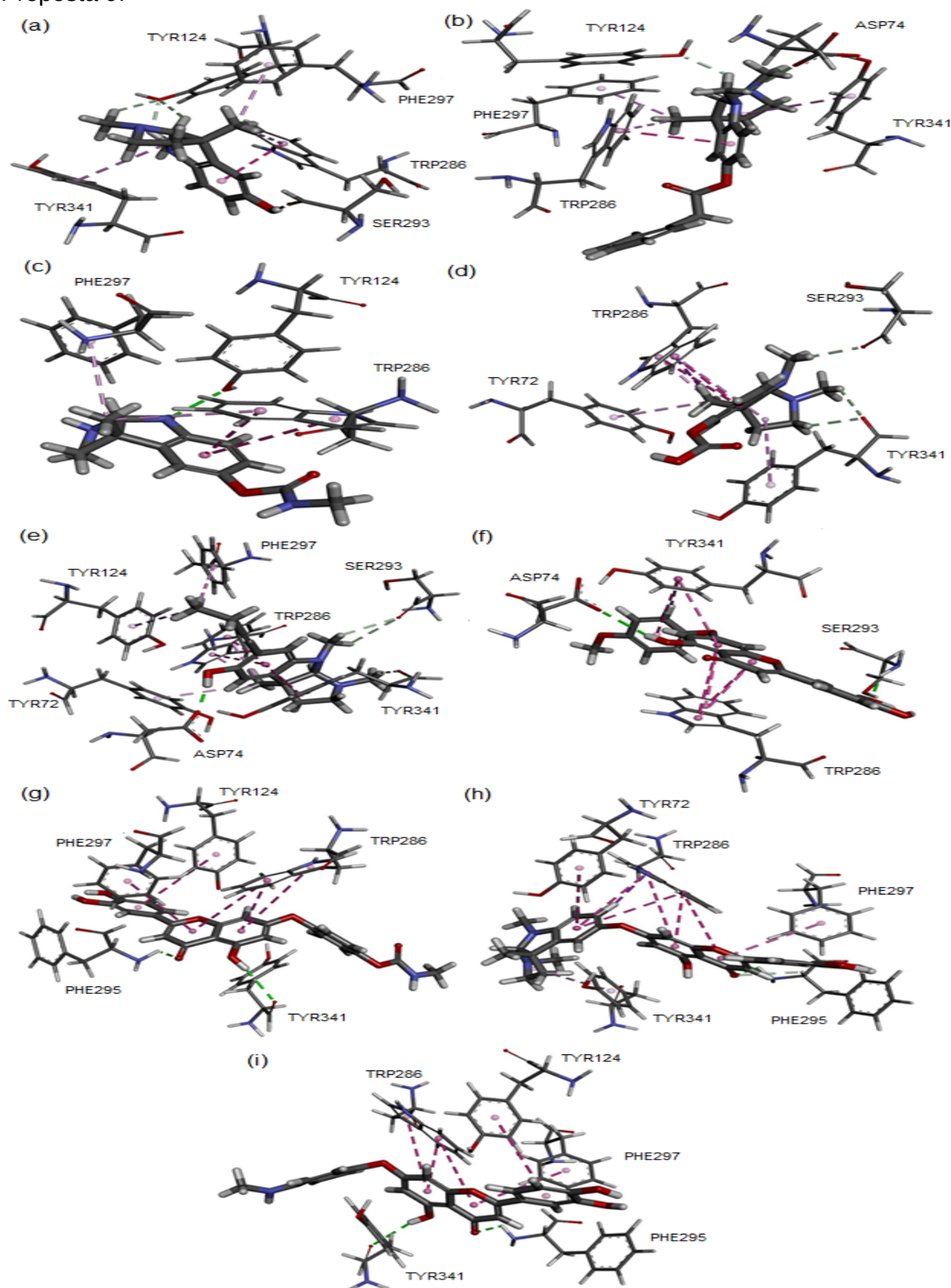
Na análise dos valores de score ChemPLP (**Tabela 11 e 12**), as propostas que apresentaram maior afinidade pelas enzimas AChE e GSK-3 $\beta$  foram: **propostas 6, 7 e 9**, valores de escore: 91,40; 89,49 e 88,00 (AChE), respectivamente, e **propostas 6, 7 e 9** (GSK-3 $\beta$ ), com valores de escore: 70,42; 69,25 e 68,75, respectivamente, todos híbridos da IChE-IGSK-3 $\beta$ .

**Figura 14** - Resultado do *docking* das propostas realizadas e suas interações com o sítio de ligação da AChE: Ligação de hidrogênio convencional (verde), ligação de hidrogênio não convencional (azul) e interação hidrofóbica (rosa). a) Proposta 1; b) Proposta 2; c) Proposta 3; d) Proposta 4; e) Proposta 5; f) Proposta 6; g) Proposta 7; h) Proposta 8; i) Proposta 9.



Fonte: Discovery studio Visualizer 4.0

**Figura 15** - Resultado do *docking* das propostas realizadas e suas interações com o sítio de ligação da GSK-3 $\beta$ : Ligação de hidrogênio convencional (verde), ligação de hidrogênio não convencional (azul) e interação hidrofóbica (rosa). a) Proposta 1; b) Proposta 2; c) Proposta 3; d) Proposta 4; e) Proposta 5; f) Proposta 6; g) Proposta 7; h) Proposta 8; i) Proposta 9.



Fonte: Discovery studio Visualizer 4.0

**Tabela 11** - Análise dos resultados de *Docking* Molecular das propostas gerada pelo programa Gold – AChE

| Molécula | Inibidor    | Aminoácido do sítio ativo | Átomos envolvidos (Inibidor-Aminoácido) | Tipo de Interação               | Distância (Å) | Score (ChemPLP) |
|----------|-------------|---------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|---------------|-----------------|
| 1        | Propostas 1 | Tyr124                    | C8H4-O2                                 | Interação de H não convencional | 1,79          | 55,70           |
|          |             |                           | C12H15-O2                               | Interação de H não convencional | 2,85          |                 |
|          |             |                           | C11H1-O2                                | Interação de H não convencional | 2,20          |                 |
|          |             | Trp286                    | Benzeno-benzeno                         | Hidrofóbica                     | 4,42          |                 |
|          |             |                           | C13-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 4,89          |                 |
|          |             | Ser293                    | O1H10-O1                                | Interação de H convencional     | 1,79          |                 |
|          |             | Phe297                    | C13-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 3,86          |                 |
|          |             | Tyr341                    | Pirrolidina-Benzeno                     | Hidrofóbica                     | 4,80          |                 |
| 2        | Proposta 2  | Asp74                     | C13H11-O3                               | Interação de não H convencional | 2,90          | 72,77           |
|          |             | Tyr124                    | C13-H13-O2                              | Interação de não H convencional | 2,14          |                 |
|          |             | Trp286                    | Benzeno-Benzeno                         | Hidrofóbica                     | 4,16          |                 |
|          |             |                           | C15-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 4,65          |                 |
|          |             | Phe297                    | C15-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 3,96          |                 |
|          |             | Tyr341                    | Pirrolidina-Benzeno                     | Hidrofóbica                     | 4,89          |                 |
| 3        | Proposta 3  | Tyr124                    | N1H5-O2                                 | Interação de H convencional     | 2,41          | 61,80           |
|          |             | Trp286                    | Benzeno-Dihidro-1 <i>H</i> -pirrol      | Hidrofóbica                     | 5,40          |                 |
|          |             |                           | Benzeno-Benzeno                         | Hidrofóbica                     | 4,14          |                 |
|          |             |                           | C13-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 4,65          |                 |
|          |             | Phe297                    | C13-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 4,25          |                 |
| 4        | Proposta 4  | Tyr72                     | C14-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 4,40          | 59,31           |
|          |             | Trp286                    | C14- Dihidro-1 <i>H</i> -pirrol         | Hidrofóbica                     | 3,45          |                 |
|          |             |                           | C14H16-Benzeno                          | Hidrofóbica                     | 2,60          |                 |
|          |             |                           | Pirrolidina-Benzeno                     | Hidrofóbica                     | 5,48          |                 |
|          |             |                           | Benzeno-Dihidro-1 <i>H</i> -pirrol      | Hidrofóbica                     | 5,62          |                 |
|          |             |                           | Benzeno-Benzeno                         | Hidrofóbica                     | 4,07          |                 |
|          |             | Ser293                    | C12H10-O1                               | Interação de H não convencional | 2,31          |                 |
|          |             | Tyr341                    | C13H13-O1                               | Interação de H não convencional | 2,67          |                 |
|          |             |                           | C10H8-O1                                | Interação de H não convencional | 2,55          |                 |
|          |             |                           | Pirrolidina-Benzeno                     | Hidrofóbica                     | 4,97          |                 |
| 5        | Proposta 5  | Tyr72                     | C13H17-Benzeno                          | Hidrofóbica                     | 4,55          | 68,82           |
|          |             | Asp74                     | O1H8-O3                                 | Interação de H convencional     | 1,94          |                 |
|          |             | Tyr124                    | C17-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 5,15          |                 |
|          |             | Trp286                    | C13-Pirrol                              | Hidrofóbica                     | 3,28          |                 |
|          |             |                           | C13-Benzeno                             | Hidrofóbica                     | 3,91          |                 |
|          |             |                           | Benzeno-Pirrol                          | Hidrofóbica                     | 5,17          |                 |
|          |             | Benzeno-Benzeno           | Hidrofóbica                             | 4,04                            |               |                 |
|          |             | C11H10-O1                 | Interação de H não convencional         | 3,08                            |               |                 |
|          |             | Ser293                    | C11H9-O1                                | Interação de H não convencional | 2,77          |                 |
| Phe297   | C17H22-     | Hidrofóbica               | 4,58                                    |                                 |               |                 |

|   |            |        |                               |                                 |      |       |
|---|------------|--------|-------------------------------|---------------------------------|------|-------|
| 6 | Proposta 6 | Tyr341 | Benzeno                       | Hidrofóbica                     | 4,40 | 89,49 |
|   |            |        | Benzeno-Benzeno C12H12-O1     | Interação de H não convencional | 2,44 |       |
|   |            | Asp74  | O4H14-O3                      | Interação de H convencional     | 2,61 |       |
|   |            |        | Diidropirano-diidro-1H-pirrol | Hidrofóbica                     | 4,24 |       |
|   |            | Trp286 | Benzeno-diidro-1H-pirrol      | Hidrofóbica                     | 5,40 |       |
|   |            |        | Diidropirano-diidro-1H-pirrol | Hidrofóbica                     | 3,50 |       |
|   |            |        | Benzeno-diidro-1H-pirrol      | Hidrofóbica                     | 4,03 |       |
|   |            |        | O7-N1H1                       | Hidrofóbica                     | 1,95 |       |
|   |            | Ser293 | Benzeno-Benzeno               | Interação de H convencional     | 4,65 |       |
|   |            |        | Benzeno-Benzeno               | Hidrofóbica                     | 5,06 |       |
|   |            |        | Benzeno C1H1-                 | Hidrofóbica                     | 2,62 |       |
|   |            | Tyr124 | Benzeno-Benzeno               | Hidrofóbica                     | 5,77 |       |
|   |            |        | Benzeno-diidro-1H-pirrol      | Hidrofóbica                     | 5,90 |       |
|   |            | Trp286 | Benzeno-diidro-1H-pirrol      | Hidrofóbica                     | 4,37 |       |
|   |            |        | Benzeno-diidro-1H-pirrol      | Hidrofóbica                     | 5,74 |       |
| 7 | Proposta 7 | Phe295 | O6-N1H2                       | Interação de H convencional     | 2,10 | 91,40 |
|   |            | Phe297 | Diidropirano-Benzeno          | Hidrofóbica                     | 5,07 |       |
|   |            | Tyr341 | O5H15-O1                      | Interação de H convencional     | 2,64 |       |
|   |            |        | Benzeno-Benzeno               | Hidrofóbica                     | 5,68 |       |
|   |            | Try72  | Benzeno-Benzeno               | Hidrofóbica                     | 5,19 |       |
|   |            |        | Benzeno-diidro-1H-pirrol      | Hidrofóbica                     | 2,81 |       |
|   |            | Trp286 | C21H12-diidro-1H-pirrol       | Hidrofóbica                     | 5,93 |       |
|   |            |        | Benzeno-diidro-1H-pirrol      | Hidrofóbica                     | 5,32 |       |
|   |            |        | Benzeno-diidro-1H-pirrol      | Hidrofóbica                     | 4,36 |       |
|   |            |        | Benzeno-diidro-1H-pirrol      | Hidrofóbica                     | 5,75 |       |
|   |            | Phe295 | Diidropirano-Benzeno O4-C1H3  | Interação de H não convencional | 2,93 |       |
|   |            |        | O4-N1H2                       | Interação de H convencional     | 2,14 |       |
|   |            | Phe297 | Diidropirano-Benzeno          | Hidrofóbica                     | 5,01 |       |
|   |            | Tyr341 | Pirrolidina-Benzeno           | Hidrofóbica                     | 5,39 |       |
|   |            |        | Benzeno-Benzeno               | Hidrofóbica                     | 5,79 |       |
| 9 | Proposta 9 | Tyr124 | Benzeno-Indol                 | Hidrofóbica                     | 5,91 | 88,00 |
|   |            |        | Benzeno-Indol                 | Hidrofóbica                     | 4,40 |       |
|   |            | Trp286 | Diidropirano-diidro-1H-pirrol | Hidrofóbica                     | 5,78 |       |
|   |            |        | O4-N1H2                       | Interação de H convencional     | 2,19 |       |
|   |            | Phe295 | Diidropirano - Benzeno        | Hidrofóbica                     | 5,19 |       |
|   |            | Tyr341 | O3H15-O1                      | Interação de H convencional     | 2,60 |       |

**Tabela 12** - Análise dos resultados de *Docking* Molecular das propostas gerada pelo programa Gold – AChE

| Molécula | Inibidor   | Aminoácido do sítio ativo | Átomos envolvidos (Inibidor-Aminoácido) | Tipo de Interação               | Distância (Å) | Score (ChemPLP) |
|----------|------------|---------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|---------------|-----------------|
| 1        | Proposta 1 | Lys85                     | C13H17-C4                               | Hidrofóbica                     | 4,21          | 41,24           |
|          |            | Asp133                    | O1H9-O1                                 | Interação de H convencional     | 1,98          |                 |
|          |            | Val135                    | O1-N1H1                                 | Interação de H convencional     | 1,91          |                 |
| 2        | Proposta 2 | Val135                    | O2-N1H1                                 | Interação de H convencional     | 2,12          | 51,12           |
| 3        | Proposta 3 | Val135                    | N1H5-O1                                 | Interação de H convencional     | 2,10          | 43,50           |
|          |            |                           | C10H9-O1                                | Interação de H não convencional | 2,96          |                 |
| 4        | Proposta 4 | Asp133                    | Benzeno-C3                              | Hidrofóbica                     | 4,83          | 46,37           |
| 5        | Proposta 5 | Lys85                     | Benzeno-C4                              | Hidrofóbica                     | 5,45          | 51,09           |
|          |            |                           | O1-N2H15                                | Interação de H convencional     | 2,10          |                 |
|          |            |                           | O1-C6H13                                | Interação de H não convencional | 3,02          |                 |
| 6        | Proposta 6 | Lys85                     | O7-N2H15                                | Interação de H convencional     | 1,56          | 70,42           |
|          |            |                           | Benzeno-C3                              | Hidrofóbica                     | 5,00          |                 |
|          |            | Val135                    | O1-N1H1                                 | Interação de H convencional     | 2,10          |                 |
|          |            |                           | O4H14-O1                                | Interação de H convencional     | 1,85          |                 |
| 7        | Proposta 7 | Lys85                     | C4-Benzeno                              | Hidrofóbica                     | 5,18          | 69,25           |
|          |            |                           | O7-C5H12                                | Interação de H não convencional | 2,70          |                 |
|          |            | Val135                    | O5-O1H15                                | Interação de H convencional     | 1,80          |                 |
| 8        | Proposta 8 | Lys85                     | Benzeno-C4                              | Hidrofóbica                     | 5,15          | 72,27           |
|          |            |                           | O6-N2H15                                | Interação de H convencional     | 1,67          |                 |
|          |            |                           | O4-N1H1                                 | Interação de H convencional     | 2,13          |                 |
|          |            | Val135                    | O3-N1H1                                 | Interação de H convencional     | 2,04          |                 |
|          |            |                           | O4H7-O1                                 | Interação de H convencional     | 1,61          |                 |
| 9        | Proposta 9 | Lys85                     | O4-N2H15                                | Interação de H convencional     | 1,78          | 68,73           |
|          |            |                           | O4-C6H12                                | Interação de H não convencional | 2,77          |                 |
|          |            | Asp133                    | Diidropirano-C4                         | Hidrofóbica                     | 2,10          |                 |
|          |            |                           | O5H16-O1                                | Interação de H convencional     | 1,63          |                 |
|          |            |                           | O6H17-O1                                | Interação de H convencional     | 1,63          |                 |
|          |            | Val135                    | O5-N1H1                                 | Interação de H convencional     | 1,72          |                 |

Em estudo realizado por Hiremathad et al. (2016), foram avaliados trihíbridos, com fragmentos da Tacrina-S-alilcisteína-benzotiazol (TAC-SAC-BTA), anti-AChE, antioxidante e anti- $\beta$ A, respectivamente, e Tacrina-S-propargilcisteína-benzotiazol (TAC-SPRC-BTA) no programa GOLD 5.1, no qual foram observadas interações  $\pi$ - $\pi$  com os resíduos Trp84 e Phe330 do sítio catalítico da AChE e interações  $\pi$ - $\pi$  com os AA Trp279 e Tyr70 do sítio periférico aniônico.

Os fragmentos ftalimida e benzilamina de derivados da isoindolina-1,3-diona apresentaram interações  $\pi$ - $\pi$  e CH- $\pi$  com os resíduos dos subsítios aniônico (F330, F331, W84) e aniônico periférico (W279, Y334) da AChE e a benzilamina mostrou interações cátion- $\pi$  com esses mesmos resíduos. O grupo benzil do inibidor (2-(5-(Benzilamino)pentil)isoindolina-1,3-diona estabelece uma interação  $\pi$ - $\pi$  com o W84, amina protonada interagem com resíduo F330 por interação cátion- $\pi$  e esse mesmo grupamento forma ponte de hidrogênio com uma molécula de água e o grupo hidroxil do AA Y121. Ademais, o inibidor 2-(5-(3-Clorobenzilamino)pentil)isoindolina-1,3-diona além de realizar uma interação  $\pi$ - $\pi$  com o W84, faz uma interação do halogênio com o grupo carboxil do resíduo E199 e a cadeia carbônica do G441 (GUZIOR et al., 2015).

Segundo Prati et al. (2014), a classe de inibidores 6-amino-4-fenil-3,4-dihidro-1,3,5-triazin-2(1H)-onas são compostos multialvo promissores com atividade inibitória para a BACE-1 e GSK-3 $\beta$ . Uma série de conjugados de berberina exibiram atividade antioxidante e inibiram a agregação do peptídeo  $\beta$ A demonstrando serem bons candidatos a fármacos multialvo em estudo realizado por Jiang et al. (2011).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

---

O planejamento de novos fármacos na terapia da DA é fundamental para buscar novas alternativas terapêuticas que diminuam os sintomas e reduzam a progressão da doença. Atualmente, a maioria dos fármacos atuam em um único alvo, entretanto, em doenças multifatoriais, esses compostos nem sempre podem atuar de maneira eficiente. A DA é uma patologia complexa e que tem inúmeras alterações bioquímicas. Portanto, uma nova abordagem de candidatos a fármacos que atuam em dois ou mais alvos biológicos vem crescendo nos últimos anos.

No presente estudo, 13 derivados de produtos naturais com atividade inibitória para a AChE e GSK-3 $\beta$  foram selecionados. Ao realizar a simulação de *docking*, observou-se que esses compostos interagiram com as enzimas AChE e GSK-3 $\beta$  através de interações de hidrogênios e hidrofóbica e o inibidor **10** exibiu maior afinidade com ambas as enzimas. Na predição do grupamento farmacofórico, as 8 moléculas alinhadas mostraram uma região aromática e duas regiões aceptoras de hidrogênio e na análise das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, os inibidores exibiram bons resultados, exceto o composto **10**, que não demonstrou absorção oral e teve permeabilidade baixa em células Caco-2 e MDCK. Sendo assim, a Fisostigmina (composto **1**) e a Luteolina (composto **12**) foram utilizadas como protótipos para o planejamento dos novos candidatos a fármacos IChE e dos IChE-IGSK-3 $\beta$ .

A Fisostigmina foi eleita como protótipo por apresentar boa atividade inibitória e bons resultados *in silico* no presente estudo e a Luteolina, por ser o único IGSK-3 $\beta$ . A partir desses protótipos, 5 propostas de IChE e 4 híbridos multialvo foram desenvolvidos e todos apresentaram atividade anti-Alzheimer. Esses candidatos a fármacos IChE e híbridos IChE-IGSK-3 $\beta$ , tiveram ótimos resultados nas predições farmacocinéticas e toxicológicas, sendo as propostas **1**, **2** e **5**, os inibidores que apresentaram os melhores resultados. Entretanto, os híbridos **6**, **7**, **8** e **9** obtiveram a maior afinidade pelas enzimas AChE e GSK-3 $\beta$ .

Deste modo, as propostas **1** e **2** e os candidatos a fármacos multialvo, propostas **6** e **8** foram eleitos como promissores inibidores da AChE e GSK-3 $\beta$ . Em vista disso, os resultados obtidos no presente trabalho destacam a importância no planejamento de fármacos multialvos e o potencial desses novos híbridos IChE-IGSK-3 $\beta$  para o tratamento da DA.

- ABBASI, M. A.; AHMAD, S.; RASOOL, S.; KHAN, K. M.; ASHRAT, M.; NASAR, R.; ISMAIL, T. Sulfonamide derivatives of 2-amino-1-phenylethane as suitable cholinesterase inhibitors **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 739–745, 2014.
- ABBASI, S. W.; KULSOOM, S.; RIAZ, N. In silico pharmacophore model generation for the identification of novel butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 2716–2722, 2012.
- ACCELRY'S SOFTWARE Inc., Discovery studio Modeling environment, Release 4.0, San Diego: Accelrys Software Inc., 2007.
- ADAM-VIZI, V.; STARKOV, A. A. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: How to read the facts. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. S413–S426, 2010.
- AGRAWAL, R.; JAIN, P.; DIKSHIT, S.N. Ligand-based pharmacophore detection, screening of potential pharmacophore and docking studies, to get effective glycogen synthase kinase inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 11, p. 5504–5535, 2013.
- AHMED, T.; GILANE, A. U.; ABDOLLAHI, M.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Berberine and neurodegeneration: A review of literature. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 5, p. 970–979, 2015.
- ALMEIDA, J. R. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.
- AMBURE, P.; KAR, S.; ROY, K. BioSystems pharmacophore mapping-based virtual screening followed by molecular docking studies in search of potential acetylcholinesterase inhibitors as anti-Alzheimer's agents. **BioSystems**, v. 116, p. 10–20, 2014.
- AMIN, J.; PAQUEL, C.; BAKER, A.; ASUNI, A. A.; LOVE, S.; HOLMES, C.; HUGON, J.; NICOLI, J. A.; BROCHE, D. Effect of amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) immunization on hyperphosphorylated tau: A potential role for glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$ . **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 41, n. 4, p. 445–457, 2015.
- ANAND, P.; SINGH, B.; SINGH, N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1175–1180, 2012.
- ANZALI, S.; BARNICKET, G.; CEZANNE, B.; KRUG, M.; FILIMONOW, D.; POROIKOV. Discriminating between drugs and nondrugs by prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 2432–2437, 2001.

ARAB, H. H.; SALAMA, S. A.; OMAR, H. A.; ARAFA EL, S. A.; MAGHRABI, I. A. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: Novel anti-ulcer actions. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–21, 2015.

AVILA, J.; LUCAS, J. J.; PEREZ, M.; HERNANDEZ, F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. **Physiological reviews**, v. 84, n. 2, p. 361–384, 2004.

BABILONI, C.; DEL PERCIO, C.; BORDET, R.; BOURRIEZ, J. L.; BENTIVOGLIO, M.; PAYOUX, P.; DERAMBURE, P.; DIX, S.; INFARINATO, F.; LIZIO, R.; TRIGGIANI, A.; RICHARDSON, J. C.; ROSSINI, P. M. Effects of acetylcholinesterase inhibitors and memantine on resting-state electroencephalographic rhythms in Alzheimer's disease patients. **Clinical Neurophysiology**, v. 124, n.5, p. 837-850, 2013.

BAJDA, M.; GUZIOR, N.; IGNASIK, M.; MALAWSKA, B. Multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 4949-4975, 2011.

BALAKRISHNAN, N.; SANTHANA, J.; NARESH, R. Discovery of novel GSK-3 $\beta$  inhibitors using pharmacophore and virtual screening studies. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 8, p. 303-311, 2015.

BANSODE, S. B.; JANA, A. K.; BATKULWAR, K. B; WARKAD, S. D.; JOSHI, R. S.; SENGUPTA, N.; KULKARNI, M. J. Molecular investigations of protriptyline as a multi-target directed ligand in Alzheimer's disease. **PLOS ONE**, v. 9, p. e105196, 2014.

BASTIANETTO, S.; MÉNARD, C.; QUIRION, R. Neuroprotective action of resveratrol. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 6, p. 1195–1201, 2015.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 493–506, 2006

BAUTISTA-AGUILERA, O. M.; ESTEBN, G.; BOLEA, I.; NICOLIK, K.; AGBABA, D.; MORALEDA, I; IRIEPA, I.; SAMADI, A.; SORIANO, E.; UNSENT. M. Contelleset al. Design, synthesis, pharmacological evaluation, QSAR analysis, molecular modeling and ADMET of novel donepezil-indolyl hybrids as multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 82–95, 2014.

BAUTISTA-AGUILERA, O. M.; ESTEBN, G.; BOLEA, I.; CHIOUNICOLIK, K.; AGBABA, D.; MORALEDA, I; IRIEPA, I.; SAMADI, A.; SORIANO, E.; UNSENT. M. Multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis, biochemical evaluation, ADMET, molecular modeling, and QSAR analysis of novel donepezil-pyridyl hybrids. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1893–1910, 2014b.

BERG, S.; BERGH, M.; HELLBERG, S.; HOGDING,; LO-ALFREDSSONNN, Y.; SODERMAN, F.; von BERG, S.; WEIGELT, T.; ORMO, M.; XUE, Y.; TUCKER, J.; NEELISEN, J.; JERNING, E.; NEELISSEN, JERNING, E.; NILSSN, Y.; BHAT, R. Discovery of novel potent and highly selective glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )

inhibitors for Alzheimer's disease: design, synthesis, and characterization of pyrazines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 9107-9119, 2012.

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

BERTRAM, L.; McQUEEN, M. M.; BLACKER, D.; TANZI, R. E. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: **The AlzGene database. Nature Genetics**, v. 39, n. 1, p. 17-23, 2007.

BHAT, R.; XUE, Y.; BERG, S.; HELLBERG, S.; ORMÖ, M.; NILSSON, Y.; RADESÄTER, A.-C.; JERNING, E.; MARKGREN, P.-O.; BORGEGÅRD, T.; NYLÖF, M.; GIMÉNEZ-CASSINA, A.; HÉRNÁNDEZ, F.; LUCAS, J. J.; DÍAZ-NIDO, J.; AVILA, J. Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. **Journal of Biological Chemistry**, v. 46, n. 278, 45937-45945, 2003.

BITZINGER D. I.; GRUBER, M.; TÜMMLER, S.; MICHELS, B.; BUNDSCHERER, A.; HOPF, S.; TRABOLD, B.; GRAF, B. M.; ZAUSIG, Y. A. Species- and concentration-dependent differences of acetyl- and butyrylcholinesterase sensitivity to physostigmine and neostigmine. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 1-6, 2016.

BOLEA, I.; GELLA, A.; UNZETA, M. Propargylamine-derived multitarget-directed ligands: fighting Alzheimer's disease with monoamine oxidase inhibitors. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, p. 893-902, 2013.

BOLOGNESI, M. L.; SIMONI, E.; ROSINI, M.; MIRANINI, A.; TUMIATTI, V.; MELCHIORRE, C. Multitarget-directed ligands: innovative chemical probes and therapeutic tools against Alzheimer's disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2797-2806, 2011.

BONACORSO, H. G.; SILVIA, LETÍCIA B.; ROCHA, J. B. T.; NOGARA, P. A. L.; WACZUK, E. P.; SILVIA FERNANDA, DA.; BUENO, D. C.; KADER, YERIAH N. A. M.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N. Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of 7-amine-spiro[chromeno[4,3-b]quinoline-6,1'-cycloalkanes] as new tacrine hybrids. **Tetrahedron Letters**, p. 1-6, 2015.

BONDA, D. J.; WANG, X.; PERRY, G.; NUNOMURA, A.; TABATON, M.; ZHU, X.; SMITH, M. A. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. **Neuropharmacology**, v. 59, p. 290-294, 2010.

BONESI, M. et al. Berberis aetnensis and B. libanotica: a comparative study on the chemical composition, inhibitory effect on key enzymes linked to Alzheimer's disease and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology Research**, v. 65, p. 1726-1735, 2013.

BORES, G.M.; HUGER, F. P.; PETKO, W.; MUTLIB, A.E.; CAMACHO, F.; RUSH, D. K.; SELK, D. E.; WOLF, V.; KOSLEY, R. W.; JR, DAVIS L.; VARGAS, H. M. Pharmacological evaluation of novel alzheimer's disease therapeutics: Acetylcholinesterase inhibitors Related to Galanthamine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, p. 728-738, 1996.

BOWERS, S.; XU, Y.; YUAN, S.; PROBST, G. D.; HOM, R. K.; et al. Structure-based design of novel dihydroisoquinoline BACE-1 inhibitors that do not engage the catalytic aspartates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 2181-2186, 2013.

BRASSEN, S.; ADLER, G. Short-term effects of acetylcholinesterase inhibitor treatment on EEG and memory performance in Alzheimer patients: an open, controlled trial. **Pharmacopsychiatry**, v. 36, p. 304-308, 2003.

BRITO, A. J.; RAJ, T. L. S.; CHELLIAH, D. A. Prediction of biological activity spectra for few anticancer drugs derived from plant sources. **Ethnobot Leaflets**, v.12, p. 801-810, 2001.

BUCKLER, J. N.; TAHER, E. S.; FRASER, N. J.; WILLIS, A. C.; CARR, P. D.; JACKSON, C. J.; BANWELL, M. G. The synthesis of certain derivatives and analogues of (-)- and (+)-galanthamine and an assessment of their capacities to inhibit acetylcholine esterase. **Journal of Organic Chemistry**, v. 82, n. 15, p. 7869–7886, 2017.

BURNS, A., RUSSELL, E., PAGE, S. New drugs for Alzheimer's disease. **British Journal of Psychiatry**, v. 174, p. 476-479, 1999.

BUTINI, S.; GABELLIERI, E.; BRINDISI, M.; CASAGNI, A.; GUARINO, E.; HULEATT, P. B.; RELITTI, N.; PIETRA, V.; MARINELLI, L.; GIUSTINIANO, M.; NOVELLINO, E.; CAMPIANI, G.; GEMMA, S. Novel peptidomimetics as BACE-1 inhibitors: Synthesis, molecular modeling, and biological studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 85-89, 2013.

CAI, Z.; WANG, C.; YANG, W. Role of berberine in Alzheimer's disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 12, p. 2509–2520, 2016.

CAI, Z.; ZHAO, Y.; ANDZHAO, B. Roles of glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v 9, p. 864-879, 2012.

CAO, H.; KELLY, M. A.; KARI, F.; DAWSON, H. D.; JR, J. F. U.; COVES, S.; ROUSSEL, A. M.; ANDERSON, R.A. Green tea increases anti-inflammatory tristetraprolin and decreases pro-inflammatory tumor necrosis factor mRNA levels in rats. **Journal of Inflammation**, v. 4, p. 1–12, 2007.

CAPPELL, J.; HERRMANN, N.; CORNISH, S.; LANCTÔT, K. L. The pharmacoeconomics of cognitive enhancers in moderate to severe Alzheimer's disease. **CNS Drugs**, v. 24, p909-927, 2010.

CARIELLO, N. F.; WILSON, J. D.; BRITT, B. H.; WEDD, D. J.; BURLINSON, B.; GOMBAR, V. Comparison of the computer programs DEREK and TOPKAT to predict bacterial mutagenicity. **Mutagenesis**, v. 17, n. 4, p. 321–329, 2002.

CARREIRAS, M. C. MENDES, E.; PERRY, M. J.; FRANCISCO, A. P.; MARCO-CONTELLAS, J. The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1745–1770, 2013.

CASTRO, M. J.; RICHMOND, V.; ROMERO, C.; MAIER, M. S.; ESTÉVES-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; FARAONI M. B.; MURRAY, A. P. Preparation, anticholinesterase activity

and molecular docking of new lupane derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 3341-3350, 2014.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L.; CAPSONI, S.; ANDRISANO, V.; BARTOLINI, M.; MARGOTTI, E.; CATTANEO, A.; RECANATINI, M.; MELCHIORRE, C. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 3689-3662, 2007.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L.; MINARINI, A.; ROSINI, M.; TUMIATTI, V.; MELCHIORRE, C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 347-372, 2008.

CAVALLI, A.; POLUZZI, E.; DE PONTI, F.; RECANATINI, M. Toward a pharmacophore for drugs inducing the long QT syndrome: insights from a CoMFA study of HERG K(+) channel blockers. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3844 – 3853, 2002.

CERA, T. P.; PANCOTE, C. G. Planejamento de fármacos. **Revista Científica UNILAGO**, v. 1, n. 1, p. 137–148, 2013.

CHAE, Y. J.; Lee, H. J.; JEON, J. H.; KIM, I. B.; SUNG, K. W.; HAHN, S. J. Effects of donepezil on hERG potassium channels. **Brain Research**, v. 1597, p. 77–85, 2015.

CHEN, Y.; SUN, J.; HUANG, Z.; LIAO, H.; PENG, S.; LEHMANN, J.; ZHANG, Y. NO-donating tacrine derivatives as potential butyrylcholinesterase inhibitors with vasorelaxation activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 11, p. 3162–3165, 2013b.

CHEN, Y. et al. Pretreatment of PC12 cells with 17 $\beta$ -estradiol prevents  $\alpha\beta$ -induced down-regulation of CREB phosphorylation and prolongs inhibition of GSK-3 $\beta$ . **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 50, n. 3, p. 394–401, 2013a.

CHEUNG, J.; Gary, E. N.; SHIOMI, K.; ROSENBERRY, T. L. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territrem B show peripheral site flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 4, n. 11, p. 1091–1096, 2013.

CHIAN, S.; THPA, R.; CHI, Z.; WANG, X. J.; TANG, X. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 447, n. 4, p. 602–608, 2014.

CHIOU, W. H.; KAO, C. L.; TSAI, J. C.; CHANG, Y. M. Domino Rh-catalyzed hydroformylation–double cyclization of *o*-amino cinnamyl derivatives: applications to the formal total syntheses of physostigmine and physovenine. **Chemical Communications**, v. 49, p. 8232–8234, 2013.

CHOI, E. K.; JUNG, H.; KWAK, K. H.; YEO, S. J.; PARK, C. Y.; RYU, T. H.; JEON, Y. H.; PARK, K. M.; LIM, D. G. Effects of allopurinol and apocynin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Transplantation Proceedings**, v. 47, n. 6, p. 1633–1638, 2015.

CHOI, J.; KIM, H.; PARK, S.; TAE, J. Asymmetric total synthesis of (–)-galanthamine via intramolecular heck reaction of conjugated diene. **Synlett**, v. 24, p. 379–382, 2013.

COFFMAN, K.; BRODNEY, M.; COOK, J.; LANYON, L.; PANDIT, J.; SAKYA, S.; SCHACHTER, J.; TSENG-LOVERING, E.; WESSEL, M. 6-Amino-4-(pyrimidin-4-

yl)pyridones: Novel glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 5, p. 1429–1433, 2011.

COGHLAN, M. P.; CULBERT, A. A.; CROSS, D. A. E.; CORCORAN, S. L.; YATES, J. W.; PEARCE, N. J.; RAUSCH, O. L.; MURPHY, G. J.; CARTER, P. S.; COX, L. R.; MILLS, D.; BROWN, M. J.; HAIGH, D.; WARD, R. W.; SMITH, D. G.; MURRAY, K. J.; REITH, A. D.; HOLDER, J. C. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. **Chemistry Biology**, v. 7, n. 9, p. 793–803, 2000.

CORBETT, A.; PICKETT, J.; BURNS, A.; CORCORAN, J.; DUNNETT, S. B.; EDILSON, P.; HAGAN, J. J.; HOLMES, C.; JONES, E.; KATONA, C.; KEARNS, I.; KEHOE, P.; MUDHER, A.; PASSMORE, A.; SHEPHERD, N.; WALSH, F.; BALLARD, C. Drug repositioning for Alzheimer's disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 833–846, 2012.

CORDER, E. H.; SAUNDERS, A. M.; STRITTMATTER, W. J.; SCHMECHEL, D. E.; GASKELL, P. C.; SMALL, G. W.; ROSES, A. D.; HAINES, J. L.; PERICAK-VANCE, M. A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 921–923, 1993.

CRISAN, L.; PACUREANU, L.; AVRAM, S.; KURUNCZI, L.; SIMON, Z. QSAR study and molecular docking on indirubin inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 1, 2013.

CZELEŃ, P. Inhibition mechanism of CDK-2 and GSK-3  $\beta$  by a sulfamoylphenyl derivative of indoline — a molecular dynamics study. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, p. 1–11, 2017.

DA ROCHA; M. D.; VIEGAS, F. P. D.; CAMPOS, H. C.; NICASTRO, P. C.; FOSSALUZZA, P. C.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; VIEGAS JR, C. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders II: Alzheimer's disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 10, n. 2, p. 251–270, 2011.

DAMAR, U.; GERSNER, R.; JOHNSTONE, J. T.; SHACHTER, S.; ROTENBERG, A. Huperzine A: A promising anticonvulsant, disease modifying, and memory enhancing treatment option in Alzheimer's disease. **Medical Hypotheses**, v. 99, p. 57–62, 2017.

DE FERRARI, G. V.; CANALES, M. A.; SHIN, I.; WEINER, L. M.; SILMAN, I.; INESTROSA, N. C. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. **Biochemistry**, v. 40, p. 10447–10457, 2001.

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

DIAS, K. S. T.; DE PAULA, C. T.; RIQUEL, M. M.; LAGO, S. T.; COSTA, K. C. M.; VAZ, S. M.; MACHADO, R. P.; LIMA, L. M. S.; VIEGAS JUNIOR, C. Aplicações recentes da abordagem de fármacos multialvo para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, 609–648, 2015.

DIAZ-HERNANDEZ, J. I.; GOMES-VILLAFUERTE, R.; LEÓN-OTEGUI, M.; HONTECILLAS-PRÍETO, L.; DEL PUERTO, A.; TREJO, J. L.; LUCAS, J. J.; GARRIDO, J. J.; GUALIX, J.; MIRAS-PORTUGAL, M. T.; DIAZ-HERNANDEZ, M. In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 $\beta$  and secretases. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 8, p. 1816–1828, 2012.

DINELEY, K. T.; WESTERMAN, M.; BUI, D.; BELL, K.; ASHE, K. H.; SWEATT, J. D. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors: in vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 12, p. 4125–4133, 2001.

DOBLE, B. W.; ANDWOODGETT, J. R. Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial–mesenchymal transitions. **Cells Tissues Organs**, v. 185, 73–84, 2007.

DOHLER, F.; SEPULVEDA-FALLA, D.; KRAEMANN, S.; ALTMERPPEN, H.; SCHLÜTER, H.; HILDEBRANDE, D.; ZERR, I.; MATSCHKE, J.; GLATZEL, M. High molecular mass assemblies of amyloid- $\beta$  oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease. **Brain**, v. 137, n. 3, p. 873–886, 2014.

DROR, O.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Novel approach for efficient pharmacophore-based virtual screening: method and applications. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 10, p. 2333–2343, 2009.

DUNNETT, S. B.; FIBIGER, H. C. Role of forebrain cholinergic systems in learning and memory: relevance to the cognitive deficits of aging and Alzheimer's dementia. **Progress in Brain Research**, v. 98, p. 413–420, 1993.

EASTON, A.; SANKARANARAYANAN, S.; TANGHE, A.; et al. Effects of sub-chronic donepezil on brain Abeta and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 230, n. 2, p. 279–289, 2013.

ELAGAWANY, M.; IBRAHIM, M. A.; AHMED, H. E. A.; EL-ETRAWY, A. S.; GHIATY, A.; ABDEL-SAMII, Z. K.; EL-FEKY, S. A.; BAJORATH, J. Design, synthesis, and molecular modelling of pyridazinone and phthalazinone derivatives as protein kinases inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 7, p. 2007–2013, 2013.

ELKAMHAWY, A.; LEE, J.; PARK, B.; PARK, I.; PAE, A. N.; ROH, J. E. Novel quinazoline-urea analogues as modulators for A $\beta$ -induced mitochondrial dysfunction: Design, synthesis, and molecular docking study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 466–475, 2014.

ESPINOZA-FONSECA, L.M. The benefits of the multi-target approach in drug design and discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 896–897, 2006.

FARLOW, M. A clinical overview of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **International Psychogeriatrics**, v. 14, p. 93–126, 2002.

FARR, S. A.; RIPLEY, J. L.; SULTANA, R.; ZHANG, Z.; NIEHOLF, M. L.; PLATT, T. L.; MURPHY, M. P.; MORLEY, J. E.; KUMAR, V.; BUTTERFIELD, D. A. Antisense oligonucleotide against GSK-3 $\beta$  in brain of SAMP8 mice improves learning and memory

and decreases oxidative stress: Involvement of transcription factor Nrf2 and implications for Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 387–395, 2014.

FERNANDES, T. B. CUNHA, M. R.; SAKATA, R. P.; CANDIDO, T. M.; BABY, A. R.; TAVARES, M. T.; BARBOSA, E. G.; ALMEIDA, W. P.; PARISE-FILHO, R. Synthesis, Molecular Modeling, and Evaluation of Novel Sulfonylhydrazones as Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's disease. **Archiv der Pharmazie**. v. 350, p. 1–16, 2017.

FERRER, I.; GOMEZ-ISLA, T.; PULG, B.; FEIXES, M.; RIBÉ, E.; DALFÓ, E.; AVILA, J. Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. **Current Alzheimer research**, v. 2, n. 1, p. 3–18, 2005.

FILIMONOV, D. A.; POROIKOV, V. V. Pass: Computerized prediction of biological activity spectra for chemical substances. In. *Bioactive Compound Design: Possibilities for Industrial Use*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1996.

FORDE, J. E.; ANDDALE, T. C. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 1930–1944, 2007.

FORLENZA, O. V.; TORRES, C. A.; TALIB, L. L.; DE PAULA, V. J.; JOAQUIM, H. P. G.; DINIZ, B. S.; GATTAZ, W. F. Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, p. 220-224, 2011.

FRIESNER, R. A.; BANKS, J. L.; MURPHY, R. B.; HALGREN, T.A.; KLICIC, J. J.; MAINZ, D. T.; REPASKY, M. P.; KNOLL, E. H.; SHELLEY, M.; PERRY, J. K.; SHAW, D. E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P. S. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1739-1749, 2004.

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.; CIOŚLOWSKI, 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.

FU, H.; LI, W.; LUO, J.; LEE, N. T.; LI, M.; TSIM, K. W.; PANG, Y.; YODIM, M. B.; HAN, Y. Promising anti-Alzheimer's dimer bis(7)-tacrine reduces beta-amyloid generation by

directly inhibiting BACE-1 activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, p. 631-636, 2008.

GAUTHIER, S.; LOFT, H.; CUMMINGS, J. Improvement in behavioural symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease by memantine: a pooled data analysis. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 23, p. 537-345, 2008.

GELDENHUYS, W. J.; VAN DER SCHYF, C. J. Designing drugs with multi-target activity: the next step in the treatment of neurodegenerative disorders. **Expert Opinion Drug Discovery**, v. 8, p. 115-129, 2013.

GELDMACHER, D. S. Donepezil (Aricept®) for treatment of Alzheimer's disease and other dementing conditions. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 5-16, 2004.

GELDMACHER, D. S.; PROVENZANO, G.; MCRAE, T.; MASTHEY, V.; IENI, J. R. Donepezil is associated with delayed nursing home placement in patients with Alzheimer's disease. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 51, p. 937-944, 2003.

GERSNER, R.; EKSTEIN, D.; DHAMNE, S. C.; SHACHTER, S. C.; ROTENBERG, A. Huperzine A prophylaxis against pentylentetrazole-induced seizures in rats is associated with increased cortical inhibition. **Epilepsy Research**, v. 117, p. 97-103, 2015.

GIBBS, R. B. et al. Galanthamine plus estradiol treatment enhances cognitive performance in aged ovariectomized rats. **Hormones and Behavior**, v. 60, n. 5, p. 607-616, 2011.

GIL, A. M.; MORERA, A. C.; PEREZ, M. C. M.; CASCON, M. A.; DIAZ, I. D.; MUNOZ, F. J. M.; JURADO, F. W. **Heterocyclic inhibitors of glycogen synthase kinase GSK-3**. US n. 6.872. 737 B2, 11 Maio 2000.

GOYAL, M. CHIPMAN, A. M.; HAMMOND, R.; NELSON, D. Development of dual inhibitors against Alzheimer's disease using fragment-based QSAR and molecular docking. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

GUNER, O.; CLEMENT, O.; KUROGI, Y. Pharmacophore modeling and three dimensional database searching for drug design using catalyst: recent advances. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2991-3005, 2004.

GUPTA, S.; MOHAN, C. G. Dual binding site and selective acetylcholinesterase inhibitors derived from integrated pharmacophore models and sequential virtual screening. **BioMed Research International**, v. 2014, 21p., 2014.

GUZIOR, N. BADJA, M.; STROK, M.; KURPIEWKSA, K.; LEWINSKI, K.; BRUS, B.; PISTAR, A, KOS, J.; GOBEC, S. MALLAWKSA B. . Development of multifunctional, heterodimeric isoindoline-1,3-dione derivatives as cholinesterase and  $\beta$ -amyloid aggregation inhibitors with neuroprotective properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 738-749, 2015.

HAGHANI, M.; SHABANI, M.; TONDAR, M. The therapeutic potential of berberine against the altered intrinsic properties of the CA1 neurons induced by A $\beta$  neurotoxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 758, p. 82-88, 2015.

HAIL, S. L.; OBAFEMI, A.; KLEINSCHMIDT, K. C. Successful management of olanzapine-induced anticholinergic agitation and delirium with a continuous intravenous infusion of physostigmine in a pediatric patient. **Clinical Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 162–166, 2013.

HALGREN, T. A.; MURPHY, R. B.; FRIESNER, R. A.; BEARD, H. S.; FRYE, L. L.; POLLARD, W. T.; BANKS, J. L. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1750-1759, 2004.

HAMPEL, H.; MESULAM, M. M.; CUELLO, A. C.; KHACHATURIAN, A. S.; FARLOW, M. R.; SNYDER, P. J.; GIACOBINI, E.; KHACHATURIAN, Z. S. Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: Emerging evidence from translational and clinical research. **Alzheimer's and Dementia**, p. 1–14, 2017.

HAMULAKOVA, S.; JANOVEC, L.; HRABINOVA, M.; SPILOVSKA, K.; KORABECNY, J.; KRISTIAN, P.; KUCA, K.; IMRICH, J. Synthesis and biological evaluation of novel tacrine derivatives and tacrine – coumarin hybrids as cholinesterase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 7073–7084, 2014.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, p. 353-356, 2002.

HARRIS, F.; PIERPOINT, L. Photodynamic Therapy Based on 5-Aminolevulinic Acid and Its Use as an Antimicrobial Agent. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 6, p. 1292–1327, 2012.

HASHIGUCHI, M.; HASHIGUCHI, T. Kinase-Kinase Interaction and Modulation of Tau Phosphorylation. **Elsevier**, v. 300, p. 121-160, 2013.

HAVELEK, R. MUTHNA, D.; TOMSIK, P.; KRALOVEC, K.; SEIFRTOVA, M.; CAHLIKOVA, L.; HOSTALKOVA, A.; SAFRATOVA, M.; PERWEIN, M.; CERMAKOVA, E.; REZACOVA, M. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 275, 121-132, 2017.

HE, K.; YE, X.; WU, H.; WANG, Y.; ZOU, Z.; NING, N.; HU, Y.; CHEN, B.; FANG, X.; LI, X. The Safety and Anti-hypercholesterolemic effect of coptisine in Syrian golden hamsters. **Lipids**, v. 50, p. 185–194, 2015.

HERS, I.; TAVERE, J. M.; DENTON, R. M. The Protein Kinase C Inhibitors Bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31- 8220) are Potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity. **FEBS Letters**, v. 460, 433-436, 1999.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 89–143, 2003.

HIEMATHAD, A.; CHAND, K.; ESTEVES, A. R.; CARDOSE, S. M.; RAMSAY, R. R.; CHAVES, S.; KERI, R. S.; SANTOS, M. A. Tacrine-allyl/propargylcysteine-benzothiazole trihybrids as potential anti-Alzheimer's drug candidates. **RSC Advances**, v. 6, p 53519-53532, 2016.

HONARPARVAR, B. GOVNDER, T.; MAGUIRE, G. E. M.; SOLIMAN, M. E. S.; KRUGER, H. G. Integrated approach to structure-based enzymatic drug design: Molecular modeling, spectroscopy, and experimental bioactivity. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 493–537, 2014.

HSIUNG, G.Y.; FELDMAN, H. H. Pharmacological treatment in moderate-to-severe Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, p. 2575-2582, 2008.

HUANG, L.; LU, C.; SUN, Y.; MAO, F.; LUO, Z.; SU, T.; JIANG, H.; SHAN, W.; LI, X. Multi-target-directed Benzylidene-indanone derivatives: Anti- $\beta$  Amyloid ( $A\beta$ ) aggregation, Antioxidant, Metal chelation and Monoamine oxidase B (MAO-B) Inhibition Properties Against Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 8483-8492, 2012.

HURTADO, D. E.; MOLINA-PORCEI, L.; CARROLI, J. C.; MACDONALD, C.; ABOAGYE, A. K.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Selectively silencing gsk-3 isoforms reduces plaques and tangles in mouse models of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 21, p. 7392–7402, 2012.

HYDE, C.; PETERS, J.; BOND, M.; ROGERS, G.; HOYLE, M.; ANDERSON, R.; JEFFREYS, M.; DAVIS, S.; THOKALA, P.; MOXHAM, T. Evolution of the evidence on the effectiveness and cost-effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: systematic review and economic model. **Age and Ageing**, v. 42, p. 14-20, 2013.

HYUNG, S. J.; DETOMA, A. S.; BRENDER, J. R.; LEE, S.; VIVEKANANDAN, S.; KOCHI, A.; CHOI, J. S.; RAMAMOORTHY, A.; RUOTOLO, B. T.; LIM, M. H. Insights into anti-amyloidogenic properties of the green tea extract (-)-epigallocatechin-3-gallate toward metal-associated amyloid- species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 10, p. 3743–3748, 2013.

INBAR, Y.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Research in Computational Molecular Biology: 11th Annual International Conference, RECOMB 2007, Oakland, CA, USA, April 21-25, 2007. Proceedings. In: SPEED, T.; HUANG, H. (Eds.). **Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg**, 2007. p. 412–429.

IOAKIMIDIS, L. THOUKYDIDIS, L.; MIRZA, A.; NAEEM, S.; REYNISSA, J. Benchmarking the Reliability of QikProp. Correlation between Experimental and Predicted Values. **Molecular Informatics**, v. 27, n. 4, p. 445–456, 2008.

IRVINE, J. D.; TAKAHASHI, L.; LOCKHART, K.; CHEONG, J.; TOLAN, J. W.; SELICK, H. E.; GROVE, J. R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p. 28–33, 1999.

IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL I. Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. **Alzheimer's & Dementia**, v. 6, 420-424, 2010.

JACKISCH, R.; FÖRSTER, S.; KAMMERER, M.; ROTHMAIER, A.K.; EHRET, A.; ZENTNER, J.; FEUERSTEIN, T.J. Inhibitory potency of choline esterase inhibitors on acetylcholine release and choline esterase activity in fresh specimens of human and rat neocortex. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, n. 3, p. 635-647, 2009.

JIANG, H. WANG, X.; HUANG, L.; LUO, Z.; SU, T.; DING, K.; LI, X. Benzenediol-berberine hybrids: Multifunctional agents for Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 7228–7235, 2011.

JOPE, R. S.; YUSKAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen synthase kinase-3 (gsk3): inflammation, diseases, and therapeutics. **Neurochemical Research**, v. 32, p. 577-595, 2007.

KADIR, A. ALMKVIST, O.; WALL, A.; LÂNGSTRÖM, B.; NODRBERG, A. PET imaging of cortical 11C-nicotine binding correlates with the cognitive function of attention in Alzheimer's disease. **Psychopharmacology**, v. 188, n. 4, p. 509–520, 2006.

KAUFMANN, D.; KAUR DOGRA, A.; TAHRANI, A.; KERRMANN, F.; WINK, M. Extracts from traditional chinese medicinal plants inhibit acetylcholinesterase, a known Alzheimer's disease target. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1-16, 2016.

KESSING, L. V.; SØNDERGÅRD, L.; FORMAN, J. L.; ANDERSEN, P. K. Lithium treatment and risk of dementia. **Archives of General Psychiatry**, v. 65, p. 1331-1335, 2008.

KIM, E. A.; CHO, C. H.; KIM, D. W.; CHOI, S. Y.; HUH, J. W. Antioxidative effects of ethyl 2-(3-(benzo[d]thiazol-2-yl)ureido)acetate against amyloid  $\beta$ -induced oxidative cell death via NF- $\kappa$ B, GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin signaling pathways in cultured cortical neurons. **Free Radical Research**, v. 49, n. 4, p. 411–421, 2015.

KIMURA, H.; KAWAI, T.; HAMASHIMA, Y.; KAWASHIMA, H.; MIURA, K.; NAKAYA, Y.; HIRASAWA, ARIMITSU, K.; KAJIMOTO, T.; OHMOMO, Y.; ONO, M.; NODE, M.; SAJI, H. Synthesis and evaluation of (-)- and (+)- [ $^{11}$ C] galanthamine as PET tracers for cerebral acetylcholinesterase imaging. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 285–291, 2014.

KINOSHITA, H.; MATSUMURA, T.; ISHII, N.; FUKUDA, K.; SENOKUCHI, T.; MOTOSHIMA, H.; KKONDO, T.; TAKETA, K.; HANATANI, S.; TAKEYA, M.; NISHIKAWA, T.; ARAKI, E. Apocynin suppresses the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by inactivation of macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 431, n. 2, p. 124–130, 2013.

KITAGISHI, Y.; NAKANISHI, A.; OGURA, Y.; MATSUDA, S. Dietary regulation of PI3K / AKT / GSK-3  $\beta$  pathway in Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 6, n. 3, p. 1–7, 2014.

KNAPP, M. J.; KNOPMAN, D. S.; SOLOMON, P. R.; PNDLEBURY, W. W.; DAVIS, C. S.; GRACON, S. I. A 30-Week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. **Journal of the American Medical Association**, v. 271, n. 13, p. 985–991, 1994.

KONRATH, E. L.; PASSOS CDOS, S.; KLEIN, L. C. JR., HENIQUES, A. T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 12, p. 1701–1725, 2013.

- KOSEKI, Y.; AOKI, S. Computational medicinal chemistry for rational drug design: identification of novel chemical structures with potential anti-tuberculosis activity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 176-188, 2014.
- KUO, M. Y.; LIAO, M. F.; CHEN, F. L.; LI, Y. C.; YANG, M. L.; LIN, R. H.; KUAN, Y. H. Luteolin attenuates the pulmonary inflammatory response involves abilities of antioxidation and inhibition of MAPK and NF $\kappa$ B pathways in mice with endotoxin-induced acute lung injury. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2660–2666, 2011.
- KWON, K. J.; KIM, H. J.; SHIN, C. Y.; HAN, S. H. Melatonin potentiates the neuroprotective properties of resveratrol against beta-amyloid-induced neurodegeneration by modulating AMP-activated protein Kinase pathways. **Journal of Clinical Neurology (Korea)**, v. 6, n. 3, p. 127–137, 2010.
- LAGUNIN, A.; STEPANCHIKOVA, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. **Bioinformatics**, v. 16, p. 747-748, 2000.
- LANCTÔT, K. L.; HERRMANN, N.; LOULOU, M. M. Correlates of response to acetylcholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 28, p. 13-26, 2003.
- LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of protein ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 5851-5855, 2006.
- LECLERCQ, S.; GARNIER, M.; HOESSEL, R.; MARKO, D.; BIBB, J. A.; SNYDER, G. L.; GREENGARD, P.; BIERNAT, J.; WU, Y. Z.; MANDELKOW, E. M.; EISENBRAND, G.; MEIJERT, L. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and cdk5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. a property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? **Journal of Biological Chemistry**, n. 276, p. 251-260, 2001.
- LEDUC, V.; JASMIN-BÉLANGER, S.; POIRIER, J. APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 10, p. 469–477, 2010.
- LEE, Y.; LEE, B.; JEONG, S.; PARK, J. W.; HAN, I. O.; LEE, C. J. Increased cell proliferation and neural activity by physostigmine in the telencephalon of adult zebrafish. **Neuroscience Letters**, v. 629, p. 189–195, 2016.
- LEI, Y.; YANG, L.; YE, C. Y.; QIN, M. Y.; YANG, H. Y.; JIANG, H. L.; TANG, X. C.; ZHANG, H. Y. Involvement of intracellular and mitochondrial  $\alpha\beta$  in the ameliorative effects of huperzine A against oligomeric  $\alpha\beta$  42 induced injury in primary rat neurons. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0128366, 2015.
- LÉON, R.; GARCIA, A. G.; MARCO-CONTELLES, J. Recent Advances in the Multitarget-Directed Ligands Approach for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Medicinal Research Reviews**, v. 33, p. 139-189, 2013.
- LEOST, M.; SCHULTZ, C.; LINK, A.; WU, Y. Z.; BIERNAT, J.; MANDELKOW E. M.; BIBB, J. A.; SNYDER, G. L.; GREENGARD, P.; ZAHAREVITZ, D. W.; GUSSIO, R.; SENDEROWICZ, A. M.; SAUSVILLE, E. A.; KUNICK, C.; MEIJER, L. Paullones are potent

inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and cyclin-dependent kinase 5/p25. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5983-5994, 2000.

LESNÉ, S. E.; SHRMAN, M. A.; GRANT, M.; KUSKOWSKI M.; SCHNEIDER, J. A.; BENNETT, D. A.; SHE, K. H. Brain amyloid- $\beta$  oligomers in ageing and Alzheimer's disease. **Brain**, v. 136, n. 5, p. 1383–1398, 2013.

LI, X.; YU, H. Y.; WANG, Z. Y.; PI, H. F.; ZHANG, P.; RUAN, H. L. Neuroprotective compounds from the bulbs of *Lycoris radiata*. **Fitoterapia**, v. 88, p. 82–90, 2013.

LIANG, P. H.; LIU, J. P.; HSIN, L. W.; CHENG, C. Y. Intramolecular Heck cyclization to the galanthamine-type alkaloids: Total synthesis of ( $\pm$ )-lycoramine. **Tetrahedron**, v. 60, n. 50, p. 11655–11660, 2004.

LIU, J.; NO, T.; RUI, Z.; AD, O.; ZHANG, W. Unusual acetylation-dependent reaction cascade in the biosynthesis of the pyrroloindole drug physostigmine. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, p. 1–5, 2013.

LIU, L.; CUI, J.; YANG, Q.; JIA, C.; XIONG, M.; NING, B.; DU, X.; WANG, P.; YU, X.; LI, L.; WANG, W.; CHEN, Y.; ZHANG, T. Apocynin attenuates isoproterenol-induced myocardial injury and fibrogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 449, n. 1, p. 55–61, 2014.

LIU, X.; ZHOU, J.; ABID, M. D. N.; YAN, H.; HUANG, H.; WAN, L.; FENG, Z.; CHEN, J. Berberine attenuates axonal transport impairment and axonopathy induced by calyculin A in N2a cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93974, 2014b.

LIU, X.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; KANG, N.; ZHANO, N.; WANG, H.; XUE, J.; YU, J.; YANG, Y.; CUI, H.; CUI, L.; WANG, L.; WANG, X. Diosmin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through activating JAK2/STAT3 signal pathway in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 318–327, 2014.

LIU, Y.; FU, X.; LAN, N.; LI, S.; ZHANG, J.; WANG, S.; LI, C.; SHANG, Y.; HUANG, T.; ZHANG, L. Luteolin protects against high fat diet-induced cognitive deficits in obesity mice. **Behavioural Brain Research**, v. 267, p. 178–188, 2014.

LLORENS-MARTIN, M.; JURADO, J.; HERNÁNDEZ, F.; ÁVILA, J. GSK-3 $\beta$ , a pivotal kinase in Alzheimer disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, p. 1-11, 2014.

LO, S. N.; CHANG, Y. P.; TSAI, K. C.; CHANG, C. Y.; WU, T. S.; UENG, Y. F. Inhibition of CYP1 by berberine, palmatine, and jatrorrhizine: Selectivity, kinetic characterization, and molecular modeling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 3, p. 671–680, 2013.

LOU, H.; FAN, P.; PEREZ, R. G.; LOU, H. Neuroprotective effects of linarin through activation of the PI3K/Akt pathway in amyloid- $\beta$ -induced neuronal cell death. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 4021–4027, 2011.

LOY, C.; SCHNEIDER, L. Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2006.

LU, C.; GUO, Y.; YAN, J.; LUO, Z.; LUO, LUO, H.; YAN, M.; HUANG, L.; LI, X. Design, synthesis, and evaluation of multitarget-directed resveratrol derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5843–5859, 2013.

LUO, Y.; BOLON, B.; DAMORE, M. A.; FITZPATRICK, D.; LIU, H.; ZHANG, J.; YAN, Q.; VASSAR, R.; CITRON, M. BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. **Neurobiology of Disease**, v. 14, p. 81-88, 2003.

LY, P. T.; WU, Y.; ZOU, H.; WANG, R.; ZHOU, W.; KINOSHITA, A.; ZHANG, M.; YANG, Y.; CAI, F.; WOODGETT, J.; SONG, W. Inhibition of GSK3 $\beta$ -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, p. 224-235, 2013.

MAHAJAN, D.; BHAT, Z. F.; KUMAR, S. Epigallocatechin-3-gallate an efficient alternative to synthetic antioxidants and preservatives in cheese. **Nutrition & Food Science**, v. 47, n. 2, p. 191–203, 2017.

MAK, S.; LUK, W. W.; CUI, W.; HU, S.; TSIM, K. W.; HAN, Y. Synergistic inhibition on acetylcholinesterase by the combination of berberine and palmatine originally isolated from chinese medicinal herbs. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 53, n. 3, p. 511-516, 2014.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 90-100, 2009.

MAO, F.; YAN, J.; LI, J.; JIA, X.; MIAO, H.; SUN, Y.; HUANG, L.; LI, X. New multi-target-directed small molecules against Alzheimer's disease: a combination of resveratrol and clioquinol. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 12, p. 5936–5944, 2014.

MAQBOOL, M.; MANRAL, A.; JAMEEL, E.; HUMAR, J.; SAINI, V.; SHANDILYA, A.; TIWARI, M.; HODA, N.; JAYARAM, B. Development of cyanopyridine-triazine hybrids as lead multitarget anti-Alzheimer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 12, p. 2777–2788, 2016.

MARIDASS, M. PASS: Prediction of activity spectra for biologically active constituent of polygodial (a drimane type of dialdehyde sesquiterpene). **Newsletter**, v. 197, p. 191–197, 2008.

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

MATHURA, V. S.; PATEL, N.; BACHMEIER, C.; MULLAN, M.; PARIS, D. A 3D-QSAR model based screen for dihydropyridine-like compound library to identify inhibitors of amyloid beta (Ab) production. **Bioinformation**, v. 5, n. 3, p. 122–127, 2010.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631–639, 2004.

MEANWELL, N. A. Improving drug candidates by design: A focus on physicochemical properties as a means of improving compound disposition and safety. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 9, p. 1420–1456, 2011.

MEIJER, L.; THUNISSEN, A. M.; WHITE, A. W.; GARNIER, M.; NIKOLIC, M.; TSAI, L. H.; WALTER, J.; CLEVERLEY, K. E.; SALINAS, P. C.; WU, Y. Z.; BIERNAT, J.; MANDELKOW, E. M.; KIM, S. H.; PETTIT, G. R. Inhibition of cyclin-dependent kinases, gsk-3 $\beta$  and ck1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. **Chemistry & Biology**, v. 7, p. 51-63, 2000.

MENDES, C. T.; MURY, F. B.; MOREIRA, E. S.; ALBERTO, F. L.; FORLENZA, O. V.; DIAS-NETO, E.; GATTAZ, W. F. Lithium reduces Gsk-3 $\beta$  mRNA levels: implications for Alzheimer Disease. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 259, p. 16-22, 2009.

MESULAM, M. M. Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in Alzheimer's disease. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, n. 18, p. 4124–4144, 2013.

MILLAN, M. J. Dual-and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: Novel concepts, new drugs. **Neurotherapeutics**, 6, 53-77, 2009.

MILLER, D. K.; OELRICHS, C. E.; SUN, G. Y.; SIMONYI, A. Subchronic apocynin treatment attenuates methamphetamine-induced dopamine release and hyperactivity in rats. **Life Sciences**, v. 98, n. 1, p. 6–11, 2014.

ALONSO, D.; DORRONSORO, I.; RUBIO, L.; MUÑOZ, P.; GARCIA-PALOMERO, E.; DEL MONTE, M.; BIDON-CHANAL, A.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J.; CASTRO, A.; MEDINA, M.; MARTINEZ, A. Donepezil–tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 6588–6597, 2005.

MORIHARA, T.; HAYASHI, N.; YOKOKOJI, M.; AKATSU, H.; SIVERMAN, M. A.; KIMURA, N.; SATO, M.; SAITO, Y.; SUZUKI, T.; YANAGINA, K.; KODAMA, T. S.; TANAKA, T.; OKOCHI, M.; TAGAMI, S.; KAZUI, H.; KUDO, T.; HASHIMOTO, R.; ITOH, N.; NISHITOMI, K.; YAMAGUCHI-KABATA, Y.; TSUNODA, T.; TAKAMURA, H.; KATAYAMA, T.; KIMURA, R.; KAMINO, K.; HASHIZUME, Y.; TAKUDA, M. Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid-accumulation modifier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 7, p. 2638–2643, 2014.

MULLAN, M. Genetic contributions to causes of Alzheimer's disease: current perspectives and future directions, pp 307–309. In: New insights into genetics and pathophysiology of Alzheimer's disease: what are the clinical and therapeutic implications? **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, n. 4, p. 307-315, 2000.

NERY, L. R. **Caracterização de Modelos de Experimentação Baseados na Doença de Alzheimer em Zebrafish**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

NEWMAN, M., VERDILE, G., MARTINS, R.N., LARDELLI, M. Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, p. 346-352, 2011.

NIELSCH, U.; SCHÄFER, S.; WILD, H.; BUSCH, A. One target-multiple indications: a call for an integrated common mechanisms strategy. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 1025-1031, 2007.

NISHA, C. M.; HUMAR, A.; NAIR, PRATEEK.; GUPTA, N.; SILAKARI, C.; TRIPATHI, T.; KUMAR. Molecular Docking and in silico ADMET study reveals acylguanidine 7a as a potential inhibitor of  $\beta$ -secretase. **Advances in Bioinformatics**, v. 2016, p. 1-6, 2016.

NUNES, P. V.; FORLENZA, O. V.; GATTAZ, W. F. Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. **British Journal of Psychiatry**, v. 190, p. 359-360, 2007.

ORHAN, I. E. Current concepts on selected plant secondary metabolites with promising inhibitory effects against enzymes linked to Alzheimer's disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2252–2261, 2012.

OSET-GASQUE, M. J.; GONZÁLEZ, M. P.; PÉREZ-PEÑA, J.; GARCIA-FONT, N.; RROMERO, A.; DEL PPINO, J.; RAMOS, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SORIANO, E.; CHIOUA, M.; SAMADI, A.; RAGHUVANSHI, D. S.; SINGH, K. N.; MARCO-CONTELLS, J. Toxicological and pharmacological evaluation, antioxidant, ADMET and molecular modeling of selected racemic chromenotacrines {11-amino-12-aryl-8,9, 10,12-tetrahydro-7H-chromeno[2,3-b]quinolin-3-ols} for the potential prevention and treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 491–501, 2014.

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

PÁKÁSKI, M.; KÁLMÁN, J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 53, p. 103-111, 2008.

PAN, L.; WANG, X.; XIE, S.; LI, S.; KONG, L. Multitarget-directed resveratrol derivatives: anticholinesterases, anti-b-amyloid aggregation and monoamine oxidase inhibition properties against Alzheimer's disease. **Medicinal Chemistry Communication**, .v. 5, p. 609-616, 2014.

PANDEY, G.; KHAMRAI, J.; MISHRA, A. Generation of all-carbon quaternary stereocenters at the c-3 carbon of lactams via [3,3]-sigmatropic rearrangement and revision of absolute configuration: total synthesis of (-)-physostigmine. **Organic Letters**, v. 20, n. 1, p. 166–169, 2018.

PANDURANGAN, A. K.; DHARMALINGAM, P.; SADAGOPAN, S. K. A.; RAMAR, M.; MUNUSAMY, A.; GANAPASSAM, S. Luteolin induces growth arrest in colon cancer cells through involvement of Wnt $\beta$ -catenin GSK-3 $\beta$  signaling. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 32, n. 2, p. 131–139, 2013.

PARK, C. H.; KIM, S. H.; CHOI, W.; LEE, Y. J.; KIM, J. S.; KANG, S. S.; SUH, Y. H. Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. **Planta Medica**, v. 62, n. 5, p. 405–409, 1996.

PARRI, H. R.; HERNANDEZ, C. M.; DINELEY, K. T. Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 8, p. 931–942, 2011.

PATEL, M. B.; MISHRA, S. Hypoglycemic activity of alkaloidal fraction of *Tinospora cordifolia*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1045–1052, 2011.

PLASCHKE, K.; MÜLLER, A. K.; KOPITZ, J. Surgery-induced changes in rat IL-1 $\beta$  and acetylcholine metabolism: Role of physostigmine. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 41, n. 9, p. 663–670, 2014.

PEREIRA, D. M.; FERRERES, F.; OLIVEIRA, J. M.; GASPAR, L.; FRIA, J.; VALENTÃO, P.; SOTTOMAYOR, M.; ANDRADE, P. B. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. **Phytomedicine**, v. 17, p. 646–652, 2010.

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

PIAZZI, L.; CAVALLI, A.; COLIZZI, F.; BELLUTI, F.; BARTOLINI, M.; MANCINI, F.; RECANATINI, M.; ANDRISANO, V.; RAMPA, A. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 423–426, 2008.

PICANÇO, L. C. S., OZELA, P. F.; BRITO, M. F. B.; PINHEIRO, A. A.; PADILHA, E. C.; BRAGA, F. S.; DE PAULA, C. H. S.; DOS SANTOS, C. B.; ROSA, J. M.; HAGE-MELIM, L. I. S. Alzheimer's disease: A review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. **Current medicinal chemistry**, v. 24, p. 1–19, 2017.

POTTER, P. E.; RAUSCHKOLB, P. K.; PANDYA, Y.; SUE, L. I.; SABBAGH, M. N.; WALKER, D. G.; BEACH, T. G. Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica**, v. 122, n. 1, p. 49–60, 2012.

POZZO, E.; LA PIETRA, V.; COSIMELLI, B.; DA SETTIMO, F.; GIACOMELLI, C.; MARINELLI, L.; MARTINI, C.; NOVELLINO, E.; TALIANI, S.; GRECO, G. p53 Functional inhibitors behaving like pifithrin-  $\beta$  counteract the Alzheimer peptide non- $\beta$ -amyloid component effects in human sh-sy5y cells. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, p. 390–399, 2014.

PRADO, L. K. P. **Exercício físico em idosos: efeito nos biomarcadores periféricos de neuroproteção**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina, São Paulo, 2012.

PRAMELY, T. R.; RAJ, L. S. Prediction of biological activity spectra of a few phytoconstituents of *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, p. 375–379, 2012.

PRATI, F.; DE SIMONE, A.; BISIGNANO, P.; ARMIROTTI, A.; SUMMA, M.; PIZZIRANI, D.; SCARPELLI, R.; PEREZ D. I.; ANDRISANO, V.; PEREZ-CASTILLO, A.; MONTI, B.; MASSENZIO, F.; POLITO, L.; RACCHI, M.; FAVIA, A. D.; BOTTEGONI, G.; MARTINEZ, A.; BOLOGNESI, M. L.; CAVALLI, A. Multitarget Drug Discovery for Alzheimer s Disease: Triazinones as BACE-1 and GSK-3 b Inhibitors. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 54, n. 5, p. 1578–1582, 2015.

- PRATI, F.; BARTOLINI, M.; SIMONI, E.; DE SIMONE, A.; PINTO, A.; ANDRISANO, V.; BOLOGNESI, M. L. Quinones bearing non-steroidal anti-inflammatory fragments as multitarget ligands for Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 6254-6258, 2013.
- SYAD, A. N.; DEVI, P. K. Botanicals: a potential source of new therapies for Alzheimer's disease? **Botanics: Targets and Therapy**, v. 4, p. 11–26, 2014.
- QUEENTHY, S. S.; JOHN, B. Diosmin exhibits anti-hyperlipidemic effects in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 718, n. 1-3, p. 213–218, 2013.
- RAVES, M. L.; HAREL, M.; PANG, Y. P.; SILMAN, I.; KOZIKOWSKI, A. P.; SUSSMAN, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. **Nature Structural Biology**, v. 4, n. 1, p. 57–63, 1997.
- REED, M. N.; HOFMEISTER, J. J.; JUNGBAUER, L.; WELZEL, A. T.; YU, C.; SHERMAN, M. A.; LESNÉ, S.; LADU, M. J.; WALSH, D. M.; ASHE, K. H.; CLEARY, J. P. Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived A $\beta$  oligomers. **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 10, p. 1784–1794, 2011.
- RELKIN, N. R.; REICHMAN, W. E.; ORAZEM, J.; MCRAE, T. A large, community-based, open-label trial of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 16, p. 15- 24, 2003.
- REVETT, T. J.; BAKER, G. B.; JHAMANDAS, J.; KAR, S. Glutamate system, amyloid  $\beta$  peptides and tau protein: Functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 38, n. 1, p. 6–23, 2013.
- RICHARDSON, C.; GARD, P. R.; KLUGMAN, A.; ISAAC, M.; TABET, N. Blood pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease in relation to the use of acetylcholinesterase inhibitors. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 28, p. 1312-1317, 2013.
- ROCHAS, C.; LECOUEY, C.; GAVEN, F.; GIANNONI, P.; HAMIDOU, K.; HEDOU, D.; DUBOST, E.; GENEST, D.; YAHIAOUI, S.; FRERET, T.; BOUET, V.; DAUPHIN, F.; SANTOS, J. S. O.; BALLANDONNE, C.; CORVAISIER, S.; MALZERT-FRÉON, A.; LEGAY, R.; BOULOUEY, M.; CLAEYSEN, S.; DALLEMAGNE, P. Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and serotonergic subtype 4 receptor (5-HT<sub>4</sub>R) agonist activities as potential agents against Alzheimer's disease: the design of donecopride. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 7, 3172-3187, 2015.
- RODRIGUEZ, G.; VITALI, P.; CANFORA, M.; CALVINI, P.; GIRTLE, N.; DE LEO, C.; PICCARDO, A.; NOBILI, F. Quantitative EEG and perfusional single photon emission computed tomography correlation during long-term donepezil therapy in Alzheimer's disease. **Clinical Neurophysiology**, v. 115, p. 39-49, 2004.
- ROMERO, A.; CACABELOS, R.; OSET-GASUE, M. J. SAMADI, A.; MARCO-CONTELLAS, J. Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 7, p. 1916–1922, 2013.

- ROY, S.; KUMAR, A.; BAIG, M.H.; MSARIK, M.; PROVAZNIK, I. Virtual screening, ADMET profiling, molecular docking and dynamics approaches to search for potent selective natural molecule based inhibitors against metallothionein-III to study Alzheimer's disease. *Methods*, p. 83, p. 352–356, 2014.
- ROY, S.; KUMAR, A.; PROVAZNIK, I. Virtual screening, ADMET profiling, molecular docking and dynamics approaches to search for potent selective natural molecule based inhibitors against metallothionein-III to study Alzheimer's disease. *Methods*, v. 83, p. 105–110, 2015.
- ROY, S.; MALLICK, S.; CHAKRABORLY, T.; GHOSH, N.; SINGH, A. K.; MANNA, S.; MAJUMDAR, S. Synthesis, characterisation and antioxidant activity of luteolin-vanadium(II) complex. *Food Chemistry*, v. 173, p. 1172–1178, 2015.
- SANDERSON, D. M.; EARNSHAW, C. G. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: The DEREK system. *Human & Experimental Toxicology*, v.10, p. 261-273, 1991.
- SAWMILLER, D.; HABID, A.; LI, S.; DARLINGTON, D.; HOU, H.; IAN, J.; SHYTLE, R. D.; SMITH, A.; GIUNTA, B.; MORI, T.; TAN, J. Diosmin reduces cerebral A $\beta$  levels, tau hyperphosphorylation, neuroinflammation, and cognitive impairment in the 3xTg-AD mice. *Journal of Neuroimmunology*, v. 299, p. 98–106, 2016.
- SAWMILLER, D.; SON, L.; SHAHADUZZAMAN, M.; SMITH, A. J.; OBREGON, D.; GIUNTA, B.; BORLONGAM, C. V.; SANBERG, P. R.; TAN, J. Luteolin reduces Alzheimer's disease pathologies induced by traumatic brain injury. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 1, p. 895–904, 2014.
- SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural Brain Research*, v. 221, n. 2, p. 555–563, 2011.
- SCHMITT, B.; BERNHARDT, T.; MOELLER, H. J.; HEUSER, I.; FROLICH, L. Combination therapy in Alzheimer's disease: a review of current evidence. *CNS Drugs*, v. 18, p. 827–844, 2004.
- SCHMITT, K.; GRIMM, A.; KAZMIERCZAK, A.; STROSZNAJDER, J. B.; GÖTZ, J.; ECKERT, A. Insights into mitochondrial dysfunction: Aging, Amyloid- $\beta$ , and Tau-A deleterious trio. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 16, n. 12, p. 1456–1466, 2012.
- SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Deterministic Pharmacophore Detection via Multiple Flexible Alignment of Drug-Like Molecules. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 15, n. 7, p. 737–754, 2008.
- SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. *Nucleic Acids Research*, v. 36, p. W223-W228, 2008.
- SCHROETER, H.; SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C.; WILLIAMS, R. J. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *The Biochemical journal*, v. 358, n. 3, p. 547–557, 2001.

SEMIGHINI, E. P. In silico design of beta-secretase inhibitors in Alzheimer's disease. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, p. 283–290, 2014.

SEMIGHINI, E. P. **Planejamento racional de inibidores da beta-secretase em mal de Alzheimer**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2013.

SEONG, S. H.; ALI, M. Y.; KIM, H. R.; UNG, H. A.; CHOI, J. S. BACE1 inhibitory activity and molecular docking analysis of meroterpenoids from *Sargassum serratifolium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 15, p. 3964–3970, 2017.

SHAO, S.; LI, M.; DU, W.; SHAO, F.; WANG, W. Galanthamine, an acetylcholine inhibitor, prevents prepulse inhibition deficits induced by adolescent social isolation or MK-801 treatment. **Brain Research**, v. 1589, p. 105–111, 2014.

SHEN, C.; CHEN, L.; JIANG, L.; LAI, T. Y. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of chronic glaucoma. **Neuroscience Letters**, v. 600, p. 132–136, 2015.

SHIN, K. Y.; KIM, K. Y.; SUH, Y. Dehydroevodiamine·HCl enhances cognitive function in memory-impaired rat models. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 55–64, 2017.

SIMONYL, A.; SERFOZO, P.; LEHMIDI, T. M.; CUI, J.; GU, Z.; LUBAHN, D. B.; SUN, A. Y.; SUN, G. Y. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 2183–2193, 2012.

SMITH, D. G.; BUFFET, M.; FENWICK, A. F.; HAIGH, D.; IFE, R. J.; SAUNDERS, M.; SLINGSBY, B. P.; STACEY, R.; WARD, R. W. 3-Anilino- 4-arylmeleimides: Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 635-639, 2001.

SONKUSARE, S. K.; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: memantine, a new hope. **Pharmacological Research**, v.51, p. 1-17, 2005.

SOTO-ORTEGA, D. D.; MURPHY, B. P.; GONZALEZ-VELASQUEZ, F. J.; WILSON, K. A.; XIE, F.; WANG, Q.; MOSS, M. A. Inhibition of amyloid- $\beta$  aggregation by coumarin analogs can be manipulated by functionalization of the aromatic center. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2596-2602, 2011.

SWAROWSKY, A. **Alterações astrogliais hipocâmpais no modelo de demência por lesão do núcleo basal magnocelular de ratos com ácido ibotênico**. Tese (Doutorado em Neurociências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

TANAKA, A.; KOGA, S.; HIRAMATSU, Y. Donepezil-induced adverse side effects of cardiac rhythm: 2 cases report of atrioventricular block and Torsade de Pointes. **Internal Medicine**, v. 48, n. 14, p. 1219–1223, 2009.

TERWEL, D.; DEWACHTER, I.; VAN LEUVEN, F. Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **NeuroMolecular Medicine**, v. 2, n. 2, p. 151–165, 2002.

- THAL, L. J.; MSCHWARTZ, G.; SANO, M.; WEINER, M.; KNOPMAN, D.; HARREL, L.; BODENHEIMER, S.; ROSSOR, M.; PHILPOT, M.; SCHOR, J.; GOLDBERG, A. A multicenter double-blind study of controlled-release physostigmine for the treatment of symptoms secondary to Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 47, p. 1389–1395, 1996.
- TURNER, R. S.; THOMAS R. G.; CRAFT, S.; VAN DYCK, C. H.; MINTZER, J.; REYNOLDS, B. A.; BREWER, J. B.; RISSMAN, R. A.; RAMAN, R.; AISEN, P. S. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. **Neurology**, v. 85, p. 1383–1391, 2015.
- UNO, Y.; IWASHITA, H.; TSUKAMOTO, T.; UCHIYAMA, N.; KAWAMOTO, T.; KORI, M.; NAKANISHI, A. Efficacy of a novel, orally active GSK-3 inhibitor 6-methyl-N-[3-[[3(1-methylethoxy)propyl]-carbamoyl]-1H-pyrazol-4-yl]pyridine-3-carboxamide in tau transgenic mice. **Brain Research**, v. 1296, p. 148–163, 2009.
- URIARTE-PUEYO, I.; CALVO, M. I. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 34, p. 5289–302, 2011.
- VAN DER SCHYF, C. J.; GELDENHUYS, W. J.; YODIM, M. B. Multifunctional neuroprotective drugs for the treatment of cognitive and movement impairment disorders, including Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Drugs Future**, v. 31, 447–460, 2006.
- VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHOM, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.
- WAGER, T. T.; CHANDRASEKARAN, R. Y.; HOU, X.; TROUTMAN, M. D.; VERHOEST, P. R.; VILLALOBOS, A.; WILL, Y. Defining desirable central nervous system drug space through the alignment of molecular properties, in vitro ADME, and safety attributes. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 1, n. 6, p. 420–434, 2010.
- WANG, C. H.; ALLURI, S.; NIKIGOSYAN, G.; GANGULY, A. K. Novel synthesis of physostigmine and physostigmine analogs. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 27-28, p. 3046–3049, 2016.
- WANG, H. Y.; BAKSHI, K.; SHEN, C.; FRANKFURT, M.; TROCMÉ-THIBIERGE, C.; MORAIN, P. S 24795 Limits  $\beta$ -Amyloid- $\alpha$ 7 Nicotinic Receptor Interaction and Reduces Alzheimer's Disease-Like Pathologies. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 6, p. 522–530, 2010.
- WANG, J.; CHEN, L.; SINHA, S. H.; LIANG, Z.; CAI, H.; MUNIYAN, S.; CHOU, Y. C.; YANG, C.; YAN, L.; FENG, Y.; LI, K. C.; LIN, M.; JIANG, H.; ZHENG, Y. G.; LUO, C. Pharmacophore-based virtual screening and biological evaluation of small molecule inhibitors for protein arginine methylation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7978-7987, 2012.
- WANG, L.; ESTEBAN, G.; OJIMA, M.; BAUTISTA-AGUILERA, O. M.; INOKUCHI, T.; MORALEDA, I.; IRIEPA, I.; SAMADI, A.; YODIM, M. D.; ROMERO, A.; SORIANO, E.; HERRERO, R.; FERNÁNDEZ, A. P.; RICARDO-MARTÍNEZ, M.; MARCO-CONTELLES, J.; UNZELA, M. Donepezil + propargylamine + 8-hydroxyquinoline hybrids as new multifunctional metal-chelators, ChE and MAO inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 543–561, 2014.

WANG, X.; DUBOIS, R.; ADAMS JR, J. D. Alzheimer's Disease Prevention and Use of Traditional Plant Medicines. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 12, p. 140–151, 2014.

WATKINS, P. B.; ZIMMERAN, H. J.; KNAPP, M. J.; GRACON, S. I.; LEWIS, K. W. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. **The Journal of the American Medical Association**, v. 271, n. 13, p. 992–998, 1994.

WEI, S.; CHEN, W.; IN, J.; HUANGLI, Y.; WANG, L.; SHEN, Y.; TANG, H. Multitarget-directed oxoisoaporphine derivatives: Anti-acetylcholinesterase, anti- $\beta$ -amyloid aggregation and enhanced autophagy activity against Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 22, p. 6031–6039, 2016.

WONG, E. H.; TARAIZI, F. I.; SHAHID, M. The effectiveness of multitarget agents in schizophrenia and mood disorders: Relevance of receptor signature to clinical action. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, p. 173-185, 2010.

XIANG, Q.; CHEN, Y.; CHEN, Z. Sensitive and simultaneous determination of active components in *Lycoris radiata* and rat plasma by HPLC with fluorescence detection. **Analytical Methods**, v. 6, p. 8979–8985, 2014.

XU, Z.; WANG, X.; YU, W.; XIE, S.; LI, S.; KONG, L. Design, synthesis and biological evaluation of benzyloquinoline derivatives as multifunctional agents against Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 10, p. 2368–2373, 2014.

YANG, G.; WANG, Y.; TIAN, J.; LIU, J. P. Huperzine A for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74916, 2013.

YANG, H. L.; CAI, P.; LIU, Q. H.; YANG, X. L.; FANG, S. Q.; TANG, Y. W.; WANG, C. WANG, X. B.; KONG, L. Y. Design, synthesis, and evaluation of salicyladimine derivatives as multitarget-directed ligands against Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 21, p. 5917–5928, 2017.

YANG, Y.; JIA, X.; FRENG, J.; WANG, Z.; CAO, Y.; LIU, J.; LI, H. Fuzheng Quxie decoction ameliorates learning and memory impairment in SAMP8 mice by decreasing tau hyperphosphorylation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

YAZDANIAN, M.; GLYNN, S. L.; WRIGHT, J. L.; HAWI, A. Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. **Pharmaceutical Research**, v.15, 1490-1495, 1998.

YODIM, M.B.; BUCCAFUSCO, J.J. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, p. 27-35, 2006.

YU, Y.; YI, Z. BIAO; LIANG, Y. Z. Main antimicrobial components of *Tinospora capillipes*, and their mode of action against *Staphylococcus aureus*. **FEBS Letters**, v. 581, n. 22, p. 4179–4183, 2007.

ZHA, X.; LAMBA, D.; ZHANG, L.; LOU, Y.; XU, C.; KANG, D.; CHEN, L.; XU, Y.; ZHANG, L.; DE SIMONE, A.; SAMEZ, S.; PESARESI, A.; STOJAN, J.; LÓPEZ, M, G.; EGEA, J.; ANDRISANO, V.; BARTOLINI, M. Novel tacrine-benzofuran hybrids as potent multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's Disease: Design, synthesis, biological evaluation and x-ray crystallography. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 114-131, 2016.

ZHANG, H. Y.; CHN, X. Q.; YANG, H. H.; JIN, G. Y.; BAI, D. L.; HU, G. Similar potency of the enantiomers of huperzine A in inhibition of [3H] dizocilpine (MK-801) binding in rat cerebral cortex. **Neuroscience Letters**, v. 295, p. 116–118, 2000.

ZHAO, P.; LI, Y.; GAO, G.; WANG, S.; YAN, Y.; ZHAN, X.; LIU, Z.; MAO, Z.; CHEN, S.; WANG, L. Design, synthesis and biological evaluation of N-alkyl or aryl substituted isoindigo derivatives as potential dual cyclin-dependent phosphorylation inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 165–174, 2014.

ZHAO, Q.; TANG, X. C. Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: Comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. **European Journal of Pharmacology**, v. 455, n. 2-3, p. 101–107, 2002.

ZHU, W.; LI, T.; GUO, Y.; FANG, C. The effect of diosmin on preventing ovarian hyperstimulation syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 3, p. e226, 2017.

ZIMMERMANN, G. R.; LEHÁR, J.; KEITH, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 1-2, p. 34–42, 2007.

ZUGNO, A. I.; JULIÃO, R. F.; BUDNI, J.; VOLPATO, A. M.; FRAGA, D. B.; PACHECO, F. D.; DEROZA, P. F.; LUCA, R. D.; DE OLIVEIRA, M. B.; HEYLMANN, A. S.; QUEVEDO, J. Rivastigmine reverses cognitive deficit and acetylcholinesterase activity induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. **Metabolic Brain Disease**, v. 28, n. 3, p. 501–508, 2013.

ZUSSY, C.; BRUREAU, A.; KELLER, E.; MARCHAL, S.; BLAYO, C.; DELAIR, B.; IXART, G.; MAURICE, T.; GIVALOIS, L. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- $\beta$  peptide injection in rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53117, 2013.