

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ PROFESSOR ALOÍSIO TEIXEIRA**

LÍGIA MARIA DIAS DAUD

**MODELAGEM MOLECULAR DE PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL
AÇÃO MULTI-ALVO NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

MACAÉ

2021

Lígia Maria Dias Daud

Modelagem Molecular de Produtos Naturais com Potencial Ação Multi-Alvo na Doença de Alzheimer

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Rio de Janeiro, *Campus Macaé* Professor Aloísio Teixeira como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Nelilma Correia Romeiro

**MACAÉ
2021**

Dias Daud, Ligia Maria
Modelagem Molecular De Produtos Naturais Com Potencial Ação Multi-alvo Na Doença De Alzheimer / Ligia Maria Dias Daud – Rio de janeiro/2021.
64 fls.
Orientador: Nelilma Correia Romeiro
Trabalho de conclusão de curso (graduação).
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro Multidisciplinar UFRJ Macaé. Bacharel em Farmácia, 2021.
1. Modelagem Molecular. 2. Doença de Alzheimer. 3. Produtos Naturais. 4. Acetilcolinesterase. 5. HDAC6

Ligia Maria Dias Daud

Modelagem Molecular De Produtos Naturais Com Potencial Ação Multi-alvo Na Doença De Alzheimer

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para a obtenção do título de Farmacêutico

Macaé, 25 de Outubro de 2021

Comissão Avaliadora:

Profa. Dra Nelilma Correia Romeiro (Presidente da Banca)

<http://lattes.cnpq.br/5103876509322346>

Profa. Dra. Denise Oliveira Guimarães-UFRJ Macaé

<http://lattes.cnpq.br/3655111598408217>

MsC Priscila Baltazar Gonçalves-PPGCF-CCS/UFRJ

<http://lattes.cnpq.br/9294446132562533>

AGRADECIMENTOS

Eu tenho muito o que agradecer. Agradeço a Deus e meus guias por me trazerem até aqui e por não me permitirem sucumbir, pois não foi nada fácil, até a um incêndio eu sobrevivi.

Agradeço a minha mãe que não deixou de acreditar em mim, mesmo quando eu não tinha mais fé, então eu caminhei muito com a fé dela.

Agradeço a minha orientadora e amiga, Nelilma, por ter me dado muitas oportunidades de recomeçar e ser um grande apoio emocional para mim. Nelilma me ensinou sobre a academia e sobre a vida.

Sou muito grata a minha amiga Priscila, não tenho muitas palavras para discorrer sobre sua importância, creio que ela sabe o quão essencial foi e é no meu processo de aprendizagem e auto-confiança.

Eu sou muito grata por ter tido o privilégio de ser aluna de professores tão incríveis que não só me ensinaram ciência, mas também apoiaram a minha longa jornada na UFRJ, em especial eu agradeço o Arídio, Leandro, Clemilson, Carol, Samantha, Rita, Edson, Juliana Latini e Stella.

Tenho amigos incríveis que não posso deixar de agradecer o apoio e afeto, a recíproca é muito verdadeira, pois amo meus amigos: Rene, Ariele, Tainã, Eduarda, Matheus, Naara, Victória, Francielle, Sâmia, Tiago e Taís.

Agradeço meus irmãos, Badie e Larissa, por terem me ajudado, mesmo que de forma indireta. Eu sou grata ao meu primo Álvaro que é como um irmão, pois sempre esteve disposto a me ouvir e me incentivar.

Finalmente, eu agradeço a minha psicóloga, dra Nilda, por ter me orientado tanto e por abrir meus olhos para enxergar que sempre fui capaz de conquistar meus objetivos.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA), uma doença neurodegenerativa progressiva, é a causa mais comum de demência e apresenta um dos problemas mais críticos que o mundo enfrenta. No Brasil, a DA e outros tipos de demência ocuparam o segundo lugar em 2016 entre as principais causas de morte em pessoas com idade ≥ 70 anos. A demência foi uma importante causa de incapacidade entre os idosos, representando a segunda e a terceira principais causas de incapacidade entre mulheres e homens idosos, respectivamente. Os atuais tratamentos para a doença de Alzheimer não são tão eficazes, então há uma grande necessidade de terapias para prevenir e / ou retardar a progressão da doença. Como a Doença de Alzheimer é multifatorial, o desenvolvimento de ligantes direcionados a múltiplos alvos (LDMAs) evoluiu como uma estratégia para direcionar estudos de novos fármacos. Essa estratégia consiste no desenvolvimento de ligantes capazes de interagir pelo menos com dois alvos terapêuticos ao mesmo tempo. Os inibidores de histona desacetilase (HDACIs), em HDAC6, têm ganhado atenção e interesse como alternativa de tratamento promissora para o campo das doenças neurodegenerativas, pois exibem propriedades neuroprotetoras (Yang *et al.*, 2017). Por exemplo, em modelo de camundongos, a inibição da HDAC6 mostrou melhora na função axonal, cuja importância em doenças neurodegenerativas como a DA já foi demonstrada. Os inibidores de acetilcolinesterase (AChE) aumentam a concentração de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, e desaceleram o progresso da DA. Diversos produtos naturais (PNs) são capazes de diminuir os sintomas e aliviar o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo a DA. Portanto, esse trabalho teve por objetivo a modelagem molecular de PNs com potencial ação multi-alvo na DA, especificamente AChE e HDAC6, tendo em vista a importância histórica da modulação de alvos de interesse por PNs. Os PNs estudados não apresentaram bom ranqueamento no estudo com a AChE de acordo com a função de *score* utilizada, a CHEMPLP. Porém, os números e tipos de interações realizadas e a comparação com o Donepezil auxiliaram na interpretação dos valores experimentais e no melhor ranqueamento dos PNs. Na análise com a HDAC6, dois dos PNs selecionados demonstraram maiores valores de *score* e maior número de interações com a enzima em comparação à Tricostatina A, o PN de referência, co-cristalizado com a HDAC6, sugerindo que estes compostos podem apresentar ação dual nessas duas enzimas. Os dados obtidos neste estudo levaram à seleção das melhores estratégias de análise por *docking* com as enzimas estudadas e deverão ser úteis na identificação de moléculas bioativas com potencial ação dual na DA.

Palavras-chave: Modelagem Molecular, Doença de Alzheimer, Produtos Naturais, Acetilcolinesterase, HDAC6

LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1: Estrutura de difração de raios X do cristal da Acetilcolinestese com Donepezil (Código PDB 4EY7).	18
Figura 2: Estrutura de difração de raios X do cristal da HDAC6 com a Tricostatina A (Código PDB 5EDU).	19
Figura 3: Estruturas de arilbenzofuranos extraídos da casca da raiz de <i>Morus alba</i> (FERREIRA <i>et al.</i> , 2021).	21
Figura 4: Estruturas dos compostos extraídos de <i>Andrographis paniculata</i> e <i>Spilanthes paniculata</i> (FERREIRA <i>et al.</i> , 2021).	22
Figura 5: Sobreposição das cadeias polipeptídicas A e B da AChE (Código PDB: 4EY7).	26
Figura 6: Sobreposição do ligante Donepezil co-cristalizado com a AChE e melhor pose obtida por <i>redocking</i> com a função de <i>scoreChemPLP</i> e raio de 15Å.	27
Figura 7: Interações observadas entre o Donepezil e a AChE no estudo de <i>redocking</i> . A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.	27
Figura 8: Interações observadas entre a Mol2 e a AChE no estudo de <i>docking</i> . A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.	30
Figura 9: Interações observadas entre a Mol1 e a AChE no estudo de <i>docking</i> . A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.	33
Figura 10: Interações observadas entre a Mol3 e a AChE no estudo de <i>docking</i> . A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.	36
Figura 11: Interações observadas entre a Mol5 e a AChE no estudo de <i>docking</i> . A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.	38
Figura 12: Interações observadas entre a Mol4 e a AChE no estudo de <i>docking</i> . A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.	40
Figura 13: Sobreposição das cadeias A (verde) e B (azul) da HDAC6 (código PDB: 5EDU).	43
Figura 14: Sobreposição do ligante co-cristalizado com a HDAC6 e melhor pose obtida	44

por *redocking* com a função de *scoreChemPLP* e raio de 15Å.

Figura 15: Interações observadas entre a Tricostatina A e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações. **44**

Figura 16: Interações observadas entre a Mol2 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações. **47**

Figura 17: Interações observadas entre a Mol3 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações. **49**

Figura 18: Interações observadas entre a Mol1 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações. **51**

Figura 19: Interações observadas entre a Mol4 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações. **54**

Figura 20: Interações observadas entre a Mol5 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações. **56**

LISTA DE GRÁFICOS	PÁGINA
Gráfico 1: Número de interações observadas entre o Donepezil e a AChE no estudo de <i>redocking</i> , por tipo.	28
Gráfico 2: Frequência das interações observadas entre o Donepezil e a AChE no estudo de <i>redocking</i> , por aminoácido.	29
Gráfico 3: Valores de <i>score</i> (CHEMPLP) obtidos no <i>docking</i> entre Donepezil, Mol1-5 e a AChE.	29
Gráfico 4: Número de interações observadas entre a Mol2 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	32
Gráfico 5: Frequência das interações observadas entre a Mol2 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	32
Gráfico 6: Número de interações observadas entre a Mol1 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	34
Gráfico 7: Frequência das interações observadas entre a Mol1 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	35
Gráfico 8: Número de interações observadas entre a Mol3 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	37
Gráfico 9: Frequência das interações observadas entre a Mol1 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	37
Gráfico 10: Número de interações observadas entre a Mol5 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	39
Gráfico 11: Frequência das interações observadas entre a Mol5 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	40
Gráfico 12: Número de interações observadas entre a Mol4 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	42
Gráfico 13: Frequência das interações observadas entre a Mol4 e a AChE no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	42
Gráfico 14: Número de interações observadas entre a tricostatina A e a HDAC6 no estudo	45

de *docking*, por tipo.

Gráfico 15: Frequência das interações observadas entre a tricostatina A e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	46
Gráfico 16: Valores de score (CHEMPLP) observados para Mol1-5, tricostatina A e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> .	47
Gráfico 17: Número de interações observadas entre a Mol2 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	48
Gráfico 18: Frequência das interações observadas entre a Mol2 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	49
Gráfico 19. Número de interações observadas entre a Mol3 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	50
Gráfico 20. Frequência das interações observadas entre a Mol3 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	51
Gráfico 21. Número de interações observadas entre a Mol1 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	52
Gráfico 22. Frequência das interações observadas entre a Mol1 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	53
Gráfico 23. Número de interações observadas entre a Mol4 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	55
Gráfico 24. Frequência das interações observadas entre a Mol4 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	54
Gráfico 25. Número de interações observadas entre a Mol5 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por tipo.	57
Gráfico 26. Frequência das interações observadas entre a Mol5 e a HDAC6 no estudo de <i>docking</i> , por aminoácido.	57

LISTA DE TABELAS	PÁGINA
Tabela 1: Fármacos utilizados no tratamento da DA.	15
Tabela 2: Compostos, em estudos de fase clínica, mais promissores em desenvolvimento para o tratamento da Doença de Alzheimer.	17
Tabela 3: Principais Produtos Naturais com ação multi-alvo em Alzheimer (VAISERMAN <i>et al.</i> , 2020).	20
Tabela 4: Interação do Donepezil com os Resíduos da AChE.	28
Tabela 5: Interação da Mol2 com os Resíduos da AChE.	31
Tabela 6: Interação da Mol1 com os Resíduos da AChE.	34
Tabela 7: Interação da Mol3 com os Resíduos da AChE.	36
Tabela 8. Interação da Mol5 com os Resíduos da AChE.	39
Tabela 9. Interação da Mol4 com os Resíduos da AChE.	41
Tabela 10. Interação da Tricostatina A com os Resíduos da HDAC6.	46
Tabela 11. Interação da Mol2 com os Resíduos da HDAC6.	49
Tabela 12. Interação da Mol3 com os Resíduos da HDAC6.	51
Tabela 13. Interação da Mol1 com os Resíduos da HDAC6.	53
Tabela 14. Interação da Mol4 com os Resíduos da HDAC6.	55
Tabela 15. Interação da Mol5 com os Resíduos da HDAC6.	57

LISTA DE ABREVIACÕES

A β - β -amiloide

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

ARG – Arginina

ASP – Aspartato

BACE1- Enzima Beta Secretase 1

DA- Doença de Alzheimer

ERO- Espécies Reativas de Oxigênio

FDA- do inglês, *Food and Drug Administration*

GLU – Glutamato

GLY – Glicina

HATs- Histonas-acetiltransferases

HDACs- Histonas-desacetilases

HDACIs-Inibidores de Histona Desacetilase

HIS – Histidina

IChE- Inibidores de Acetilcolinesterase

LDMA- Ligantes Direcionados a Múltiplos Alvos

NFTs- Emaranhados neurofibrilares

OMS- Organização Mundial da Saúde

PDB- do inglês, *Protein Data Bank*

PHE- Fenilalanina

PNs- Produtos Naturais

PRO – Prolina

SAC – Sítio Ativo Catalítico

SAP – Sítio Aniônico Periférico

THR – Treonina

TRP – Triptofano

TYR – Tirosina

VAL – Valina

SUMÁRIO	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)	13
1.1.1 O TRATAMENTO ATUAL E EFICÁCIA	14
1.1.2 MECANISMOS PATOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)	14
1.2 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	16
1.2.1 ESTRATÉGIAS MULTI-ALVO	16
1.3 IMPORTÂNCIA DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)	18
1.4 IMPORTÂNCIA DA INIBIÇÃO DAS HISTONAS DESACETILASES (HDACs)	19
1.5 PRODUTOS NATURAIS (PNs)	20
1.5.1 PRODUTOS NATURAIS INIBIDORES DA AChE	21
1.6 DOCKING MOLECULAR	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. METODOLOGIA	25
4.1 Obtenção das estruturas das Proteínas-Alvo	25
4.1.1 Validação do método: <i>Redocking</i>	25
4.1.2 Estudos de <i>Docking</i> Molecular	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26

5.1 Estudos de <i>docking</i> molecular	26
5.1.1 Seleção da estrutura da AChE	26
5.1.2 Validação do método: <i>Redocking do Donepezil com a AChE</i>	27
5.1.3 <i>Docking</i> dos PNs Selecionados com a AChE	29
5.1.3.1 Análise das Interações dos PNs Selecionados com a AChE	30
5.1.3.1.1 Análise das Interações da Mol2 com a AChE	30
5.1.3.1.2 Análise das Interações da Mol1 com a AChE	33
5.1.3.1.3 Análise das Interações da Mol3 com a AChE	36
5.1.3.1.4 Análise das Interações da Mol5 com a AChE	38
5.1.3.1.5 Análise das Interações da Mol4 com a AChE	41
5.1.4 Seleção da estrutura da HDAC6	44
5.1.4.1 <i>Docking</i> dos PNs Selecionados com a HDAC6	47
5.1.4.1.1 <i>Docking</i> da Mol2 com a HDAC6	48
5.1.4.1.2 <i>Docking</i> da Mol3 com a HDAC6	50
5.1.4.1.3 <i>Docking</i> da Mol1 com a HDAC6	52
5.1.4.1.4 <i>Docking</i> da Mol4 com a HDAC6	54
5.1.4.1.5 <i>Docking</i> da Mol5 com a HDAC6	57
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

A doença de Alzheimer (DA), uma doença neurodegenerativa progressiva, é a causa mais comum de demência e apresenta um dos problemas mais críticos que o mundo enfrenta. Características clínicas da DA incluem o declínio cognitivo, perda de memória, alterações emocionais e comportamentais, perda da coordenação motora e também transtornos psicológicos (VAISERMAN *et al.*; 2020).

A DA provoca alterações neuropatológicas e bioquímicas que podem ser divididas em duas áreas gerais: mudanças estruturais e alterações nos neurotransmissores ou sistemas neurotransmissores. Tais alterações incluem a presença de atrofia cortical difusa, degeneração neurovascular, perdas neuronais e sinápticas envolvendo vários sistemas de neurotransmissão, presença de placas senis extracelulares compostas de agregados filamentosos da proteína β -amiloide (A β) e massas neurofibrilares intracelulares, formadas principalmente pela proteína tau (DE FALCO *et al.*; 2016).

O sistema colinérgico está envolvido em processos fisiológicos críticos, como atenção, aprendizagem, memória, resposta ao estresse, vigília e sono e informações sensoriais. A perda de neurônios colinérgicos contribui para os déficits de memória e atenção, sendo assim, fármacos que atuam no sistema colinérgico representam uma opção promissora para o tratamento de pacientes com DA (H FERREIRA-VIEIRA *et al.*; 2016).

A DA e outras demências ocupam a sétima posição no *ranking* de maiores causas de morte global da Organização Mundial da Saúde (OMS). Segundo a OMS, as estimativas exatas da prevalência de demência dependem de sua definição. Em geral, essa síndrome afeta aproximadamente 5% a 8% dos indivíduos acima de 65 anos, 15% a 20% dos indivíduos acima dos 75 anos e 25% a 50% dos indivíduos acima dos 85 anos. A DA representa 50% -75% do total de indivíduos com demência, sendo mais comum nas faixas etárias mais altas (KAPLAN, *et al.*;2013).

No Brasil, a DA e outros tipos de demência ocuparam o quarto lugar entre as principais causas de morte em pessoas com idade ≥ 70 anos em 2000, mas passou para o segundo lugar em 2016. Entretanto, não foi a causa principal de morte entre pessoas com idade entre 50-69 anos. A demência foi uma importante causa de incapacidade entre os idosos, representando a segunda e a terceira principais causas de incapacidade entre mulheres e homens idosos, respectivamente. (MELO *et al.*, 2020). A DA pode ser classificada conforme a idade de início dos primeiros sintomas. A DA precoce afeta indivíduos com menos de 65 anos de idade (4-6% dos casos), enquanto a forma tardia afeta indivíduos com 65 anos ou mais. Existem fatores de

risco genéticos e adquiridos, sendo estes as doenças cerebrovasculares (fator de risco mais comumente relatado), diabetes, hipertensão, obesidade e dislipidemia (SILVA *et al.*; 2019). Portanto, a idade é um fator de risco para doenças neurodegenerativas como a DA e a doença se torna mais comum com o envelhecimento da população mundial (HOU *et al.*; 2019).

1.1.1 O TRATAMENTO ATUAL E EFICÁCIA

A Doença de Alzheimer tem o seu tratamento multidisciplinar, considerando os diferentes sinais e sintomas. O tratamento tem como objetivo estabilizar o comprometimento cognitivo, comportamento e comprometimento das realizações das atividades diárias, com o mínimo de efeitos adversos. Os fármacos de primeira linha são os inibidores da acetilcolinesterase, os fármacos colinérgicos donepezila, galantamina e rivastigmina, são recomendados para o tratamento da DA leve a moderada (Tabela 1) (HANSEN *et al.*; 2008).

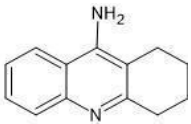
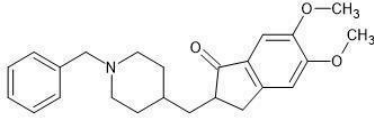
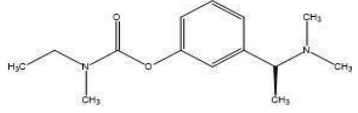
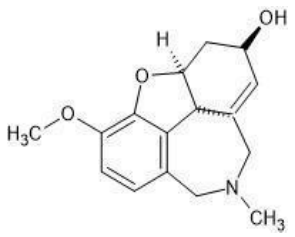
Até o momento, apenas cinco medicamentos (tacrina, donepezil, rivastigmina, galantamina e memantina) (Tabela 1) foram aprovados pelo FDA (do inglês Food and Drug Administration) para o tratamento da DA. É uma doença que não tem cura pois os medicamentos disponíveis controlam apenas os sintomas e exibem efeitos colaterais graves. Esses fármacos se baseiam em uma estratégia de alvo único e se concentram na restauração da homeostase do neurotransmissor acetilcolina. Ainda não existe tratamento eficaz disponível para a DA, que seja capaz de bloquear o processo neurodegenerativo impedindo o progresso da doença, sendo necessária a descoberta de novas abordagens terapêuticas (CUMMINGS *et al.*; 2018). Além disso, a descoberta de terapias modificadoras da DA permanece urgente, constituindo uma necessidade clínica ainda não atendida (CUMMINGS *et al.*; 2020).

1.1.2 MECANISMOS PATOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

A Doença de Alzheimer possui alguns marcadores patológicos, tais como proteína tau e A β . Na DA, a proteína tau é anormalmente hiperfosforilada e agregada em feixes de filamentos, sendo identificados no cérebro como emaranhados neurofibrilares intraneuronais de filamentos helicoidais emparelhados (NFTs) e, às vezes, misturados com filamentos retos (IQBAL *et al.*; 2010)

O peptídeo β -amilóide (A β) desempenha um papel central na neuropatologia da DA (Selkoe, 1994; 1999; Yankner, 1996; Verbeek *et al.*, 1997). A patologia surge da clivagem inadequada da proteína precursora amilóide (PPA) resultando em monômeros A β que se agregam formando A β oligomérico e, eventualmente, agregando em fibrilas e placas A β (THAL *et al.*; 2015).

Tabela 1: Fármacos utilizados no tratamento da DA.

Fármaco	Bases Farmacológicas	Efeitos Adversos Mais Comuns
<p>Tacrina</p> 	Inibidor da acetilcolinesterase.	Náuseas, vômitos e diarreia.
<p>Donepezila</p> 	Inibidor da acetilcolinesterase.	Insônia, náusea, vômito, diarreia, anorexia, dispepsia, câibras musculares e fadiga.
<p>Rivastigmina</p> 	Inibidor da butirilcolinesterase e acetilcolinesterase	Tontura, cefaléia, náusea, vômito, diarreia, anorexia, fadiga, insônia, confusão e dor abdominal
<p>Galantamina</p> 	Inibidor de acetilcolinesterase e agonista nicotínico	Náusea, vômito, diarreia, anorexia, perda de peso, dor abdominal, dispepsia, flatulência, tontura, cefaleia, depressão, fadiga, insônia e sonolência.

Na doença de Alzheimer ocorre uma interrupção no equilíbrio da sinalização anti-inflamatória e pró-inflamatória que resulta em uma inflamação crônica. Essa neuroinflamação crônica é atribuída às células da microglia ativadas e à liberação de numerosas citocinas (KINNEY *et al.*; 2018).

O estresse oxidativo foi reconhecido como um fator contribuinte no envelhecimento e na progressão de várias doenças neurodegenerativas, como a DA. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), associadas à perda da função mitocondrial, afeta diretamente a atividade sináptica e a neurotransmissão em neurônios, levando à disfunção cognitiva (TÖNNIES *et al.*; 2017).

1.2 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

1.2.1 ESTRATÉGIAS MULTI-ALVO

Os atuais tratamentos para a DA não são tão eficazes, então há uma grande necessidade de terapias para prevenir e / ou retardar a progressão da doença (CAO *et al.*; 2018). A descoberta de fármacos para o tratamento da DA costumava ser de alvo único, ou seja, visando uma única via fisiopatológica. Entretanto, com o avanço do conhecimento, observou-se que a complexidade e as múltiplas etiologias da DA são um desafio para obter os efeitos terapêuticos desejáveis usando fármacos de alvo único (ALBERTINI *et al.*; 2021).

Exemplos de fármacos de alvo único como anti-A β e BACE1, porém, foram descontinuados na fase clínica, pois podem induzir ou piorar o declínio cognitivo e distúrbios psiquiátricos em indivíduos com DA, mesmo durante os estágios iniciais da doença (IMBIMBO *et al.*; 2021).

Os inibidores das acetilcolinesterases (AChEs) são exemplos de fármacos da estratégia de alvo único e são utilizados atualmente. Eles aumentam os níveis de acetilcolina e contribuem para a regulação positiva do tônus colinérgico nos neurônios, melhorando parcialmente os sintomas cognitivos (ARYA *et al.*; 2021).

Como a Doença de Alzheimer é multifatorial, o desenvolvimento de ligantes direcionados a múltiplos alvos (LDMAs) evoluiu como uma estratégia atraente para direcionar estudos de novos fármacos. Essa estratégia emergente está centrada no desenvolvimento de ligantes capazes de interagir pelo menos com dois alvos terapêuticos ao mesmo tempo (MARAMAI *et al.*; 2020). Produtos naturais são conhecidos por terem suas ações sobre mais de um alvo, então têm sido bastante estudados no desenvolvimento de novos fármacos para diversas doenças, como a DA (BUI *et al.*; 2017).

A Tabela 2 mostra compostos que estão em estudos de fase clínica. Dentre as substâncias em fase clínica para o tratamento da DA, há compostos de diferentes classes químicas e mecanismos de ação. O GC 021109 tem como alvo as células da microglia, supostamente, via ligação ao receptor P2Y6 (ANWAR *et al.*; 2020). O nilotinibe induz a interação parkin-Beclin-1, alterando a autofagia (LONSKAYA *et al.*; 2014). O vorinostate atua na inibição das histonas-desacetilases (HDACs) (DE SOUZA *et al.*; 2020). Finalmente, o composto AMX0035 é a combinação entre fenilbutirato e ácido tauroursodeoxicólico que atua na inibição de HDACs e ativação mitocondrial (BONDAREV *et al.*; 2021).

Tabela 2: Compostos, em estudos de fase clínica, mais promissores em desenvolvimento para o tratamento da Doença de Alzheimer (IMBIMBO *et al.*, 2021).

Compostos mais promissores em desenvolvimento para o tratamento da Doença de Alzheimer				
Composto	Tipo de Composto	Mecanismo de Ação	Status de Desenvolvimento	Código do Estudo Clínico
<i>BIIB080</i>	Biológico	Oligonucleotídeo Anti Sentido para TAU	Fase 1	NCT03186989
<i>AL002</i>	Biológico	Anticorpo <i>TREM2</i>	Fase 1	NCT03635047
<i>AL003</i>	Biológico	Anticorpo CD33	Fase 1	NCT03822208
<i>GC021109</i>	Molécula Pequena	Receptor Agonista Microglial P2Y6	Fase 1	NCT02386306
<i>XPro1595</i>	Biológico	Anti TNF- α	Fase 1	NCT03943264
<i>AAVrh.10hAP OE2</i>	Biológico	Terapia de gene para APOE2 e DNAC	Fase 1	NCT03634007
ALBUTEÍNA 5%	Biológico	Troca de Plasma	Fase 2/3	NCT01561053
NILOTINIBE	Molécula Pequena	Ativação de Autofagia	Fase 2	NCT02947893
VORINOSTATE	Molécula Pequena	Inibidor de HDAC	Fase 1	NCT03056495
<i>AMX0035</i> (FENILBUTIRATO + ÁCIDO TAUROURSODEOXICÓLICO)	Molécula Pequena	Inibidor de HDAC + Ativador Mitocondrial	Fase 2	NCT03533257
DASATINIBE + QUERCETINA	Molécula Pequena	Fármacos Senolíticos	Fase 1	NCT04063124
<i>AAV-PHP.B-syn1-p38yCA</i>	Biológico	Terapia de gene para p38y	Pré Clínico	N/A

1.3 IMPORTÂNCIA DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

Os inibidores de acetilcolinesterase (IAChE) aumentam a concentração de acetilcolina na fenda sináptica. O seu uso é uma das abordagens para desacelerar o progresso da DA. A AChE tem dois sítios ativos, o sítio aniônico periférico (SAP) e o sítio ativo catalítico (SAC), para a ligação do substrato, no caso a acetilcolina. A acetilcolina se liga temporariamente no SAP por meio da interação π -cátion entre o triptofano na superfície da enzima e a amina quaternária da acetilcolina.

A forma intermediária tetraédrica da acetilcolina se liga no SAC através de uma reação entre o átomo de oxigênio do grupo acetil da acetilcolina e os resíduos de serina-histidina-glutamato da enzima AChE através de uma ligação covalente. O sítio SAP da AChE também demonstrou ter afinidade com o peptídeo A β e a ligação desta proteína à enzima promove a fibrogênese amilóide, convertendo a forma não amiloidogênica de A β na forma amiloidogênica. As mudanças conformacionais, devido a formação do complexo AChE- A β , também melhorou o metabolismo de A β e a geração da placa senil (ARYA *et al.*; 2021)

A 4EY7 é uma estrutura cristalina da acetilcolinesterase humana recombinante em complexo com donepezil (Figura 1).



Figura 1: Estrutura de difração de raios X do cristal da Acetilcolinesterase com Donepezil (Código PDB 4EY7).

1.4 IMPORTÂNCIA DA INIBIÇÃO DAS HISTONAS DESACETILASES (HDACs)

A modificação epigenética abriu um novo caminho para o estudo da DA. A metilação do DNA e a modificação das histonas se tornaram importantes focos de pesquisa. A ação conjunta entre o equilíbrio dinâmico das histonas-acetiltransferases (HATs) e histonas-desacetilases (HDACs) regula a acetilação das histonas. A acetilação de histonas ativa a transcrição de genes, enquanto a desacetilação inibe a transcrição de genes (YANG *et al.*; 2017). As HDACs são as enzimas que removem o grupo acetil do resíduo lisina de histonas e proteínas não histonas, e regula o processo de transcrição por ligação a fatores de transcrição, e regula processos celulares fundamentais, como proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular (SHUKLA *et al.*; 2020). Os inibidores de histona desacetilase (HDACIs) têm, portanto, ganhado cada vez mais atenção e interesse como uma alternativa de tratamento promissora para o campo das doenças neurodegenerativas, pois exibem propriedades neuroprotetoras e neurodegenerativas (YANG *et al.*; 2017).

Em doenças neurodegenerativas, como a DA, a homeostase da acetilação das histonas é muito prejudicada, elas se encontram em um estado de hipoacetilação. Então, a hiperacetilação das histonas produzida pela inibição direta de HDACs leva a ações neuroprotetoras (SHUKLA *et al.*; 2020).

A expressão de HDAC6 no hipocampo foi aumentada em 52% no córtex e 91% no hipocampo em casos de DA, quando comparado com cérebros sem a doença. A proteína tau pode atuar como um inibidor da atividade desacetilase da HDAC6. O impacto positivo da depleção de HDAC6 relacionado à cognição foi recentemente demonstrado através de HDAC6 de camundongos, mostrando que a inibição de HDAC6 melhorou o comprometimento da memória associativa e espacial (SIMÕES-PIRES *et al.*; 2013).

O T-518 mostrou ter atividade inibitória potente sobre a HDAC6 e seletividade em ensaios em camundongos, pois bloqueou a desacetilação da tubulina dependente de HDAC6 em Lys40 no hipocampo de camundongo. Sendo assim, T-518 é um candidato a fármaco, particularmente, promissor (ONISHI *et al.*; 2021).

A 5EDU é a estrutura cristalina da HDAC6 humana recombinante em complexo com o PN tricostatina A (HAI *et al.*, 2016) (Figura 2).

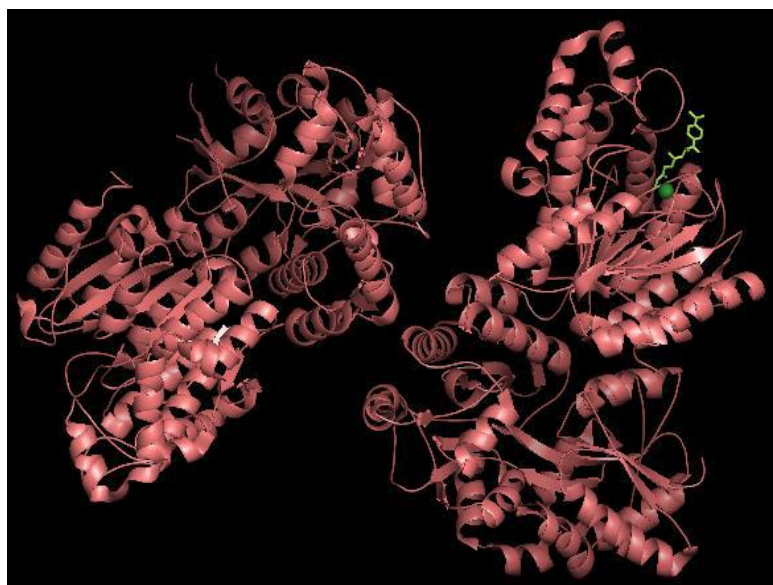


Figura 2: Estrutura de difração de raios X do cristal da HDAC6 com a Tricostatina A (Código PDB 5EDU).

1.5 PRODUTOS NATURAIS (PNs)

Diversos produtos naturais (PNs) são capazes de diminuir os sintomas e aliviar o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo a DA, atraindo a atenção da comunidade científica e da indústria farmacêutica. O foco está direcionado a gingeróis, taninos, antocianinas, triterpenos e alcalóides que têm demonstrado propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, anti-amiloidogênicas e anti-colinesterase (NOORI *et al.*; 2021).

Fitoquímicos, como resveratrol, curcumina, quercetina, genistéina e catequinas (Tabela 3) são terapias promissoras para a DA, devido à sua capacidade de afetar os principais mecanismos patogênicos da doença, incluindo estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção mitocondrial (VAISERMAN *et al.*; 2020). Um exemplo de PN com potencial anti-neuroinflamatório é a diosgenina. Além deste metabólito, a curcumina demonstrou estar envolvida na neuroproteção e recuperação da memória e aprendizagem, e exercendo propriedades anti-neuroinflamatórias e antioxidantes, indicando um possível papel benéfico no tratamento da DA (SHAL *et al.*; 2018)

Uma outra classe de metabólitos de PNs, os flavonóides, mostram extensa atividade farmacológica com ação anti-DA. Por exemplo, a silibinina é um flavonóide que age como um inibidor duplo de agregação de peptídeo AChE e A β , com potencial para o tratamento de DA (DENG *et al.*, 2017).

Finalmente, a Prosapogenina III é uma saponina esteroidal extraída de raízes de *Liriope platyphylla*, considerada uma planta medicinal por possuir propriedades neuroprotetoras e

antiinflamatórias, tendo uma potencial ação na DA. Os efeitos antiinflamatórios são ocasionados pela ativação de macrófagos inibindo a produção de mediadores inflamatórios (SHAL *et al.*; 2018).

Tabela 3: Principais Produtos Naturais com ação multi-alvo em Alzheimer (VAISERMAN *et al.*, 2020).

Principais Produtos Naturais com ação multi-alvo em Alzheimer			
<i>Produto Natural</i>	<i>Efeito</i>	<i>Mecanismo de ação</i>	<i>Estrutura</i>
Curcumina	Antioxidante, antiinflamatório e neuroprotetor	Inibição de agregação A β , estresse oxidativo e inflamação	Composto Polifenólico
EGCG (Galato de epigallocatequina)	Modulador de fatores de crescimento neural, antiinflamatório, antioxidante e regulador de apoptose	Inibe e regula a agregação A β , reduz o acúmulo de α -sinucleína, inibição de citocinas pró-inflamatórias	Polifenóis
Genisteína	Redutor do estresse oxidativo, antiinflamatório e neuroprotetor	Inibição de produção de mediadores pró-inflamatórios e inibição de agregação A β	Isoflavonóide
Quercetina	Neuroprotetor	Inibição de agregação A β e tauopatia no hipocampo e amígdala	Flavonóide
Resveratrol	Redutor do estresse oxidativo, antiinflamatório e neuroprotetor	Inibição de agregação A β , desacetilação e repressão da atividade de p53	Composto Polifenólico

1.5.1 PRODUTOS NATURAIS INIBIDORES DA AChE

Mol1 e Mol2 são arilbenzofuranos (Figura 3) extraídos da casca da raiz de *Morus alba*, que revelaram atividades inibitórias interessantes contra AChE, num estudo feito por Paudel e cols (PAUDEL *et al.*, 2019). O estudo mostrou que a Mol1 (Mulberrufen D2) se liga ao sítio ativo de AChE através de interações hidrofóbicas com TRP84, TYR334 e TRP279 e uma ligação de hidrogênio com TYR121. Estes são os primeiros resíduos de interação no sítio aniônico periférico (SAP) responsável pela inibição alostérica da AChE. No entanto, algumas outras interações hidrofóbicas ocorreram com TYR70, PHE330 e HIS440 que provavelmente contribuíram para estabilizar o composto dentro do sítio de ligação (FERREIRA *et al.*; 2021).

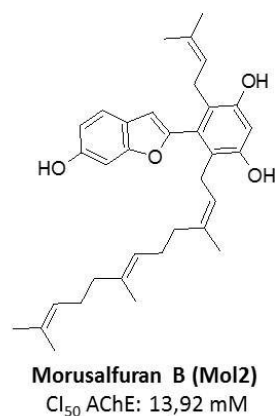
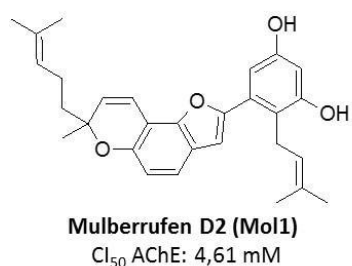


Figura 3: Estruturas de arilbenzofuranos extraídos da casca da raiz de *Morus alba* (FERREIRA *et al.*, 2021).

Panche e cols. (PANCHE *et al.*, 2019) estudaram as capacidades inibitórias de alguns compostos (Mol3, Mol4 e Mol5) de *Andrographis paniculata* e *Spilanthes paniculata* (Figura 4), que são plantas medicinais.

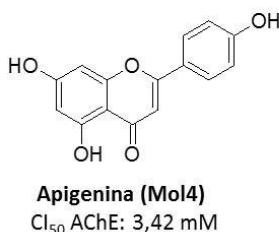
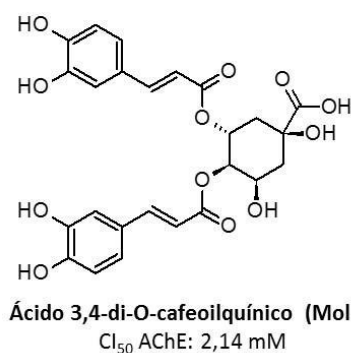


Figura 4: Estruturas dos compostos extraídos de *Andrographis paniculata* e *Spilanthes paniculata* (FERREIRA *et al.*, 2021; PANCHE *et al.*, 2019).

No estudo foi possível observar que a Mol3 estabelece algumas ligações de hidrogênio com GLU292, TYR72, THR75, TYR124 e PHE295 da AChE. Já a Mol4 exibe interações de empilhamento pi-pi com TRP286 e TYR341 da AChE por meio de seus anéis aromáticos e duas ligações de hidrogênio com PHE295. Além disso, a Mol 5 se liga à AChE por meio de interações de empilhamento pi-pi com TYR341 e TRP286, que são responsáveis por sua alta afinidade para a AChE (FERREIRA *et al.*, 2021).

1.6 DOCKING MOLECULAR

Métodos de *docking* receptor-ligante identificam o modo de ligação de moléculas candidatas a fármacos, no sítio ativo de proteínas-alvo para o tratamento de determinadas doenças (LEACH, *et al.*; 2006). O estudo de *docking*, também conhecido como “estudo de ancoramento”, dá-se conforme o posicionamento do ligante em seu sítio de ligação e, em seguida, estima sua afinidade pela proteína-alvo. A aplicação deste filtro utiliza bibliotecas de compostos que permitem a escolha da proteína alvo de acordo com seu valor de afinidade teórica (por energia ou *score*). Os estudos de *docking* podem ser realizados em duas etapas: A primeira está relacionada com a predição correta da forma do ligante, ou seja, conforme sua conformação e orientação no sítio de ligação. A segunda envolve a predição de afinidade do ligante (PICCIRILLO, *et al.*; 2018).

Para a realização do *docking*, a posição ideal do ligante e a sua orientação são determinadas através de um algoritmo de busca e uma função de *score* que classifica as soluções geradas ao final do processo. Esses algoritmos de busca definem o número de conformações dos ligantes, levando em consideração todos os graus de liberdade da estrutura, a fim de encontrar o mínimo de energia global. Já as funções de *score* avaliam a qualidade das poses de *docking*, comparando os modos de ligação do ligante/receptor observados experimentalmente com todas as outras poses exploradas pelo algoritmo de busca. Atualmente, existem várias metodologias de busca e funções de *score* (GUEDES, 2014).

Os algoritmos de busca são capazes de apresentar variações entre as configurações e orientações das moléculas envolvidas em um curto espaço de tempo, podendo ser divididos em algoritmos de *docking* rígidos ou flexíveis. No *docking* rígido, tanto o ligante quanto o receptor têm estruturas rígidas, o que não permite que o ligante e o receptor se adaptem uma ao outro, porém tem menor custo computacional (GIULIATTI, 2013).

As funções de *score* discriminam interações entre ligantes e receptores, avaliam e classificam os modos de ligação propostos. As funções são divididas em métodos baseados no campo de força, empíricos e semi-empíricos e com base no conhecimento (GIULIATTI, 2013). Métodos empíricos e semi-empíricos se baseiam no ajuste teórico de equações (regressão linear) que reproduzem dados obtidos experimentalmente (LEACH, *et al.*; 2006).

2. JUSTIFICATIVA

O tratamento atual da DA é baseado em fármacos que atingem um único alvo, os quais não são eficazes a ponto de impedir o progresso da doença, a qual tem se mostrado um problema grave de saúde pública, principalmente por conta do envelhecimento da população.

Atualmente, o desenvolvimento de novos medicamentos para a DA tem se voltado para fármacos com ação em multi-alvos. Nesse contexto, o estudo é com base no mesmo princípio terapêutico, fazendo o uso de um alvo clássico, a AChE, e um alvo que tem se mostrado promissor, a HDAC6.

Os produtos naturais são amplamente conhecidos como agentes multi-alvo, então é uma fonte interessante a ser explorada para o desenvolvimento de novos fármacos, como no caso deste estudo.

3. OBJETIVOS

Esse trabalho tem por objetivo geral o estudo de modelagem molecular de PNs com potencial ação multi-alvo na DA, tendo em vista a sua importância histórica na descoberta de fármacos e o crescente número de trabalhos mostrando a modulação de alvos de interesse na terapia da DA por PNs de fontes diversas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os seguintes objetivos específicos foram planejados para esse trabalho:

- 1)- Selecionar PNs da literatura com ação conhecida sobre a AChE;
- 2)- Realizar estudos de *docking* molecular com a AChE visando verificar interações importantes e a capacidade do método de hierarquizar moléculas quanto à atividade conhecida;
- 3)- Realizar estudos de *docking* molecular com a HDAC6 da série de PNs selecionados, visando analisar o potencial multi-alvo dessas substâncias;
- 4)- Selecionar os PNs da série estudada com maior potencial multi-alvo baseado nos estudos anteriores.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção das estruturas das Proteínas-Alvo

As estruturas cristalográficas da AChE e da HDAC de humanos foram obtidas no banco de dados PDB (do inglês, *Protein Data Bank*) (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (BERMAN *et al.*, 2006). As estruturas foram salvas no formato PDB e a escolha das mesmas foi feita seguindo alguns critérios: Resolução até 2,5 Å, presença de ligantes, cadeia polipeptídica mais completa possível e ausência de mutações.

O programa *Discovery Studio* 2016 foi utilizado para fazer a sobreposição das proteínas e para fazer o cálculo do desvio médio quadrático (RMSD - do inglês, *Root Mean Square Deviation*) verificando a correspondência entre as mesmas.

4.1.1 Validação do método: *Redocking*

A metodologia de *docking* e a escolha da função de *score* e raio de busca do sítio de ligação adequados foram validadas com a realização de *redocking* entre a proteína AChE e HDAC6 e os ligantes co-cristalizados às mesmas, utilizando-se as funções de score Goldscore, Chemscore e ChemPLP no programa GOLD versão 4.1.2. Variou-se o raio a partir do átomo de referência escolhido em 15 Å.

O átomo de oxigênio nº 1557 do resíduo de aminoácido Ser203 foi utilizado como átomo de referência na definição da região de ligação tanto para o *redocking* quanto para o *docking* molecular com a enzima AChE de *H. sapiens* (Código no PDB:4EY7) (CHEUNG *et al.*; 2012). Já para a definição da região de ligação tanto para o *redocking* e *docking* molecular da enzima HDAC6 de *H. sapiens*, o átomo de referência foi o zinco nº 5486 do resíduo de aminoácido H574 (Código no PDB:5EDU) (CHEUNG *et al.*; 2012).

O *Discovery Studio* 2016 foi utilizado para realizar a sobreposição entre as poses obtidas por *redocking* e a pose dos ligantes co-cristalizados às enzimas, calculando o valor de RMSD e verificando qual função de *score* e o raio fornecem os resultados mais semelhantes.

4.1.2 Estudos de *Docking* Molecular

As estruturas 2D dos PNs selecionados para esse estudo, Mol1, Mol2, Mol3, Mol4 e Mol5 (Figuras 3 e 4) foram construídas no programa ChemSketch v. 12.0.1 e salvas em formato mol. Em seguida, no programa Avogadro v. 1.2.0, foram adicionados os átomos de hidrogênio às estruturas, considerando-se um valor de pH de 7,4 (fisiológico) e as mesmas foram minimizadas.

Nos estudos de *docking* molecular para avaliar os possíveis modos de ligação e a investigação das interações atômicas predominantes neste processo, foi utilizado o programa GOLD versão 5.1 (VERDONK *et al.*, 2003) com as moléculas construídas na etapa anterior e a estrutura da AChE de *H. sapiens* obtida no PDB (Código: 4EY7) (CHEUNG *et al.*; 2012), como também a estrutura da HDAC6 de *H. sapiens* obtida no PDB (Código: 5EDU). No processo, as cadeias laterais dos sítios de ligação das proteínas foram mantidas rígidas. Entretanto, o programa GOLD inclui conformações diversas dos ligantes, baseado em um banco de dados interno.

As visualizações e análises dos resultados foram feitas nos programas Pymol 0.99 para Windows (DELANO, 2002), PDB SUM (DE BEER, 2013) e Discovery Studio 2016 (BIOVIA, 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos de *docking* molecular

5.1.1 Seleção da estrutura da AChE

O PDB fornece mais de 100 estruturas de AChE, sendo apenas 14 de organismos humanos. Dentre as 14 estruturas, 7 possuem resolução entre 2,0 e 2,5 Å. Destas, foi selecionada a estrutura 4EY7, porque ela já foi parametrizada anteriormente pelo grupo (Figura 5).

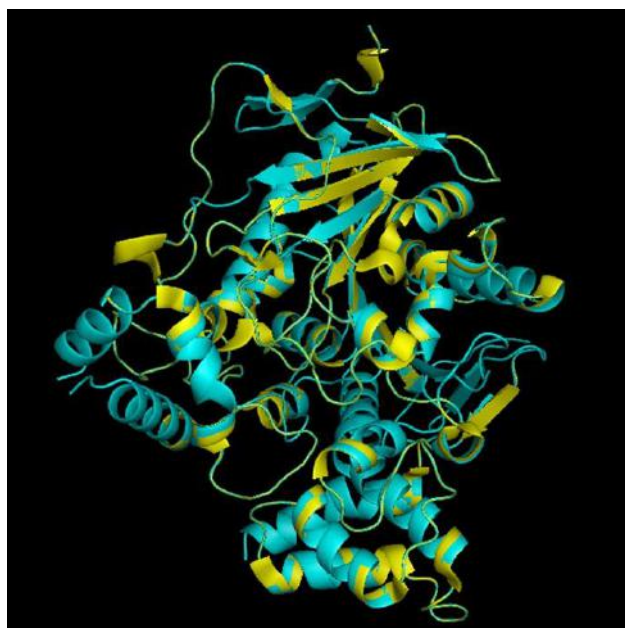


Figura 5: Sobreposição das cadeias polipeptídicas A (azul) e B (amarelo) da AChE (Código PDB: 4EY7).

A correspondência entre as estruturas também é avaliada pelo cálculo do desvio médio quadrático (RMSD), que é um valor numérico que indica o grau de semelhança entre as estruturas sobrepostas, no caso, o valor correspondente ao das cadeias polipeptídicas A e B da estrutura 4EY7 foi zero, indicando um alto grau de semelhança, pois quanto menor o valor, maior é a semelhança entre as estruturas alinhadas. Portanto, a cadeia A foi selecionada para os estudos de *docking* molecular.

5.1.2 Validação do método: *Redocking do Donepezil com a AChE*

A sobreposição entre as poses obtidas por *redocking* e a pose do ligante co-cristalizado com o Pymol 0.99 para Windows (Figura 6) mostra conformações e orientações bastante semelhantes. O cálculo do desvio médio quadrático (RMSD) realizado com *Discovery Studio* 2016 fornece um valor numérico para o grau de semelhança entre os ligantes, quanto menor for o valor obtido, maior é a semelhança, o que facilita a comparação dos resultados. Valores < 2,0 Å são considerados adequados. Nesse estudo, o menor valor de RMSD foi obtido na função de *score* ChemPLP com um raio de 15Å ou 20Å a partir do átomo de referência (Figura 6). A sobreposição do ligante donepezil co-cristalizado com o cristal otimizado por mecânica molecular possui um grau de semelhança grande, sendo assim, capaz de encontrar a pose experimental (Figura 6). Portanto, os parâmetros são adequados para a realização do docking com os PNs selecionados da literatura.

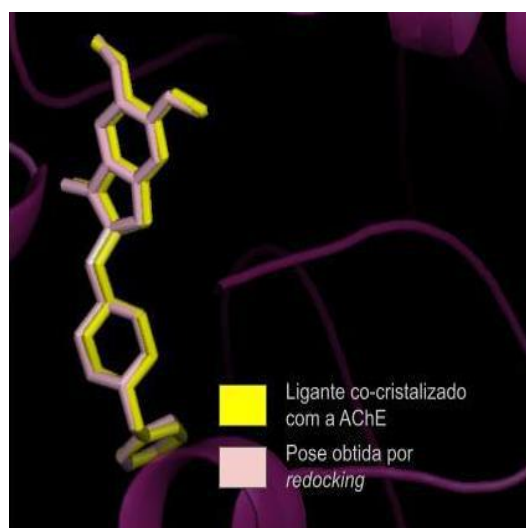


Figura 6: Sobreposição do ligante Donepezil co-cristalizado com a AChE e melhor pose obtida por *redocking* com a função de *score*ChemPLP e raio de 15Å.

A Figura 7 e a Tabela 4 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *redocking* do Donepezil.

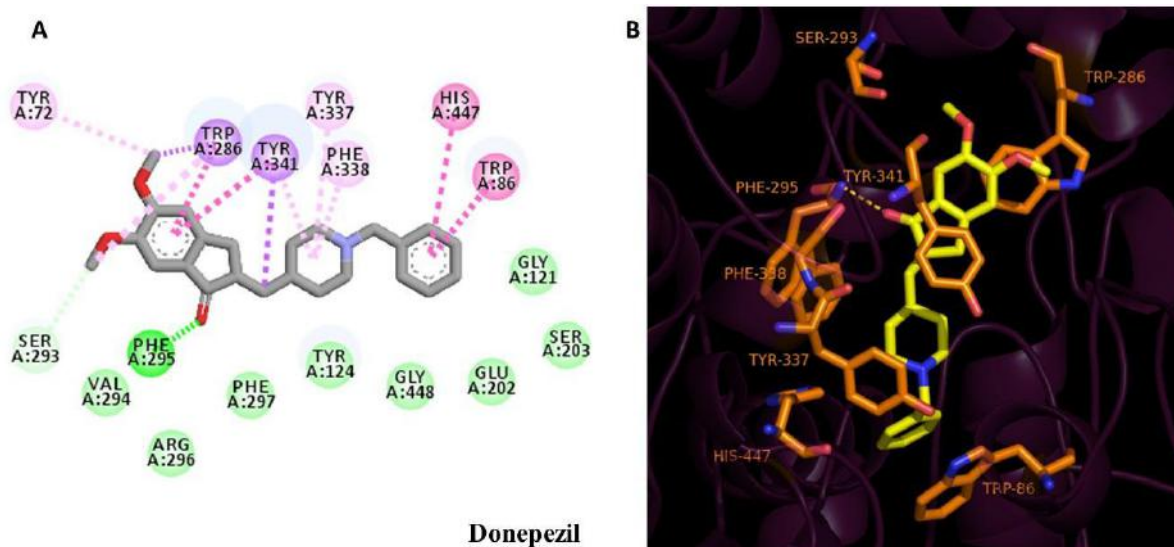


Figura 7: Interações observadas entre o Donepezil e a AChE no estudo de *redocking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.

Tabela 4: Interação do Donepezil com os Resíduos da AChE.

Resíduo de aminoácido	Tipo de Interação
PHE295	Ligação de H
SER293	Ligação de H
TYR341	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TRP86	Hidrofóbica
TRP86	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
HIS447	Hidrofóbica
TYR337	Hidrofóbica
PHE338	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica

O Gráfico 1 mostra o número de interações observadas entre o Donepezil e a AChE, por tipo. É possível observar que o tipo de interação predominante, do donepezil com a enzima, é hidrofóbica. Esse fato condiz com as características dos aminoácidos que compõem o sítio ativo da AChE, predominantemente de caráter aromático, hidrofóbico.

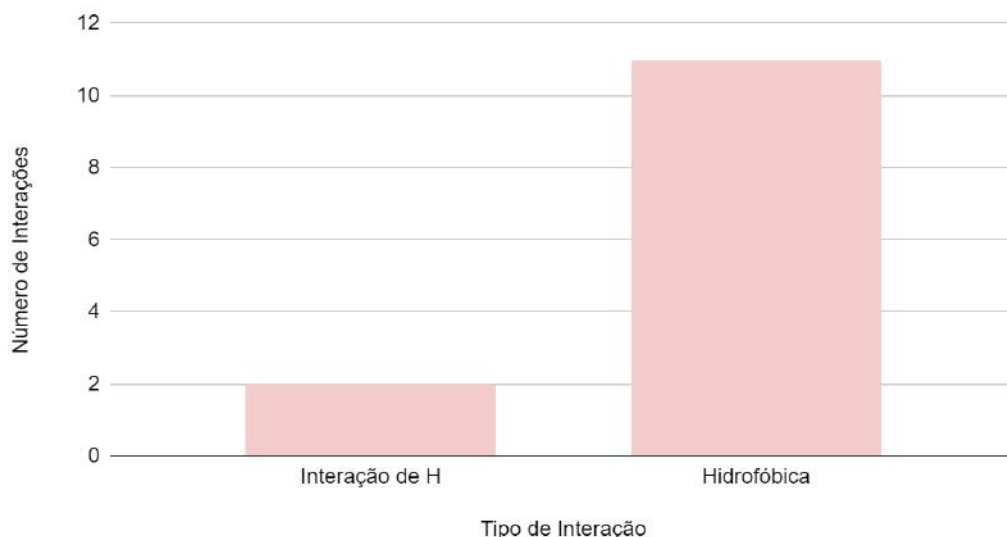


Gráfico 1: Número de interações observadas entre o Donepezil e a AChE no estudo de *redocking*, por tipo.

O Gráfico 2 mostra Frequência das interações observadas entre o Donepezil e a AChE no estudo de *redocking*, por aminoácido. Os resíduos do sítio da AChE mais envolvidos nas interações do donepezil com a enzima são: TYR341, TRP286 e TRP86.

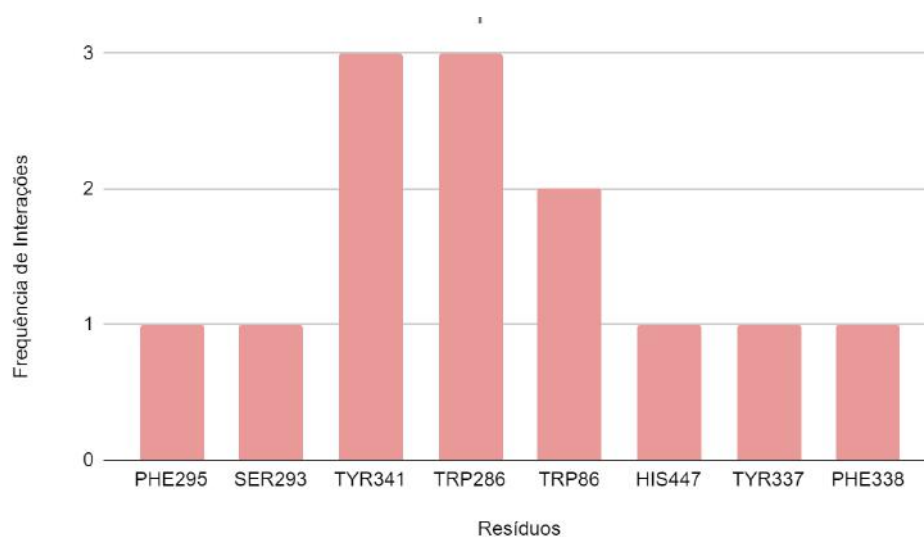


Gráfico 2: Frequência das interações observadas entre o Donepezil e a AChE no estudo de *redocking*, por aminoácido.

5.1.3 Docking dos PNs Selecionados com a AChE

A análise dos resultados de *docking* molecular entre a AChE humana, Donepezil e os PNs, mostra valores de *score* maiores para a Donepezil, Mol1, Mol2 e Mol3 (Gráfico 3).

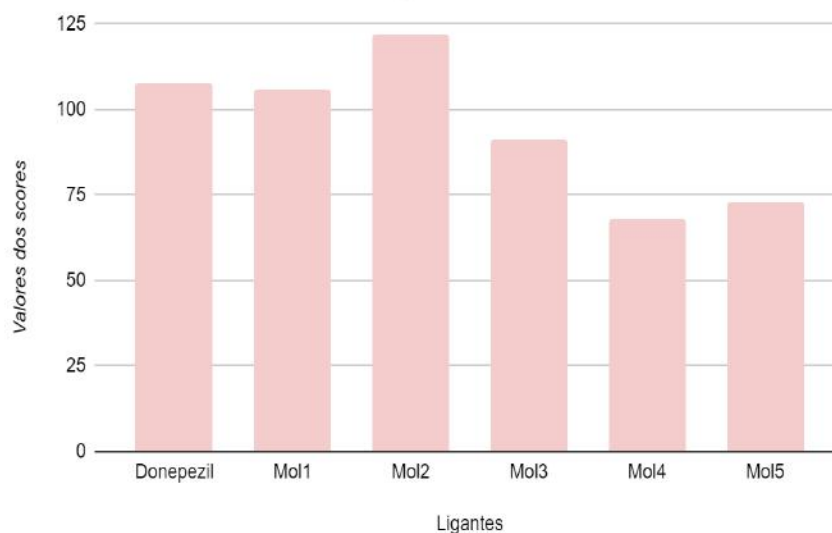


Gráfico 3: Valores de *score* (CHEMPLP) obtidos no *docking* entre Donepezil, Mol1-5 e a AChE.

Ao compararmos os inibidores, notamos uma maior afinidade teórica entre a Mol2 e a enzima, enquanto que a menor afinidade teórica foi observada para a Mol4. Esses dados mostram que a função de *score* utilizada, a CHEMPLP, não foi capaz de hierarquizar os PNs. As moléculas Mol1 e Mol3, que estão entre as mais potentes ($CI_{50} = 4,61$ mM e $2,14$ mM, respectivamente), obtiveram bons valores de *score*. Entretanto, a molécula menos potente ($CI_{50} = 13,92$ mM), Mol2, apresentou o maior *score*. Isso pode ser explicado porque as funções de *score* representam apenas as entalpias de ligação. A entropia envolvida, efeito de solvente, entre outros, não são considerados, sendo essa uma limitação inerente ao método.

5.1.3.1 Análise das Interações dos PNs Selecionados com a AChE

5.1.3.1.1 Análise das Interações da Mol2 com a AChE

A Figura 8 e a Tabela 5 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol2 e a AChE.

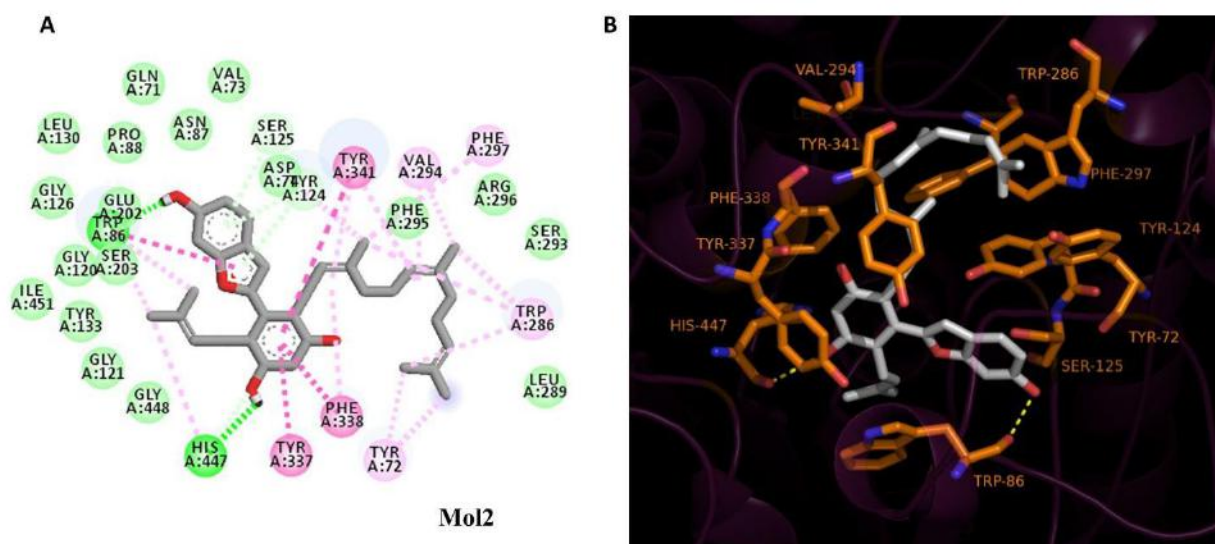


Figura 8: Interações observadas entre a Mol2 e a AChE no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.

Tabela 5: Interação da Mol2 com os Resíduos da AChE.

Resíduo de Aminoácido	Tipo de Interação
HIS447	Ligação de H
TRP86	Ligação de H
HIS447	Ligação de H
TYR124	Ligação de H
TYR124	Ligação de H
SER125	Ligação de H
TRP86	Hidrofóbica
TYR337	Hidrofóbica
PHE338	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
TYR124	Hidrofóbica
TYR124	Hidrofóbica
VAL294	Hidrofóbica
TYR72	Hidrofóbica
TYR72	Hidrofóbica
TRP86	Hidrofóbica
TRP86	Hidrofóbica
TRP86	Hidrofóbica
TYR124	Hidrofóbica

TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
PHE297	Hidrofóbica
HIS447	Hidrofóbica

A análise das interações (Figura 8) mostra que a cadeia longa, hidrofóbica, de Mol2 se estende até o PAS, preenchendo todo o *gorge* da AChE. Além disso, essa molécula é capaz de interagir com resíduos de aminoácidos aromáticos no SAC (Tabela 5) e também com o resíduo catalítico His447, por uma ligação de hidrogênio entre uma das hidroxilas fenílicas e o átomo de oxigênio da carbonila do esqueleto peptídico desse aminoácido.

O Gráfico 4 mostra o número de interações observadas entre a Mol2 e a AChE, por tipo. É possível observar que o tipo de interação predominante com a enzima, é hidrofóbica. Entretanto, essa molécula também foi capaz de realizar 6 ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da AChE. Esses dados justificam o maior valor de *score* observado para essa molécula quando comparada ao Donepezil.

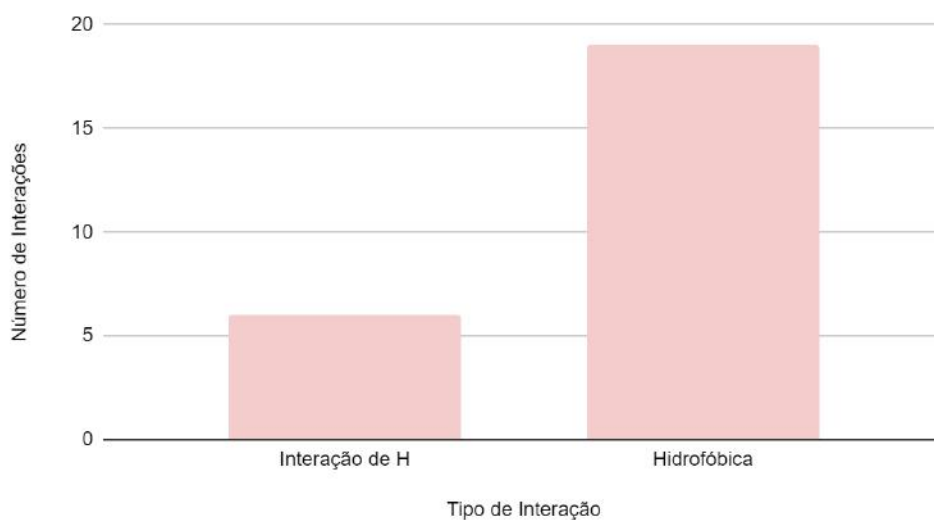


Gráfico 4: Número de interações observadas entre a Mol2 e a AChE no estudo de *docking*, por tipo.

O Gráfico 5 mostra Frequência das interações observadas entre a Mol2 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido.

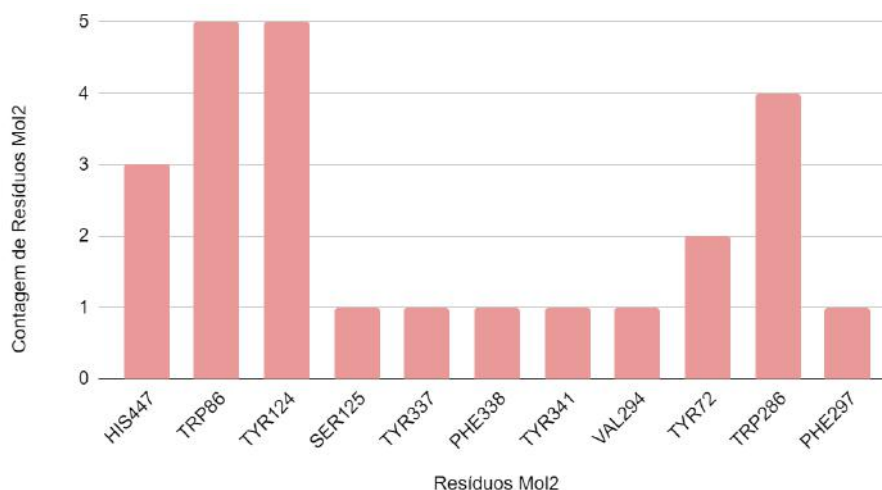


Gráfico 5: Frequência das interações observadas entre a Mol2 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido.

A Mol2 interage com onze resíduos diferentes. Em comum ao ligante donepezil cristalizado na AChE, a Mol2 interagiu com: HIS447, TRP86, TYR337, PHE338, TYR341 e TRP286. Os resíduos com maior interação com a Mol2 foram: HIS447, TRP86, TYR124 e TRP286. O donepezil também apresenta maior número de contatos com o resíduo TRP286 e TRP86, ou seja, a Mol2 e o donepezil se ligam com maior frequência a dois resíduos em comum.

5.1.3.1.2 Análise das Interações da Mol1 com a AChE

A Figura 9 e a Tabela 6 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol1 e a AChE.

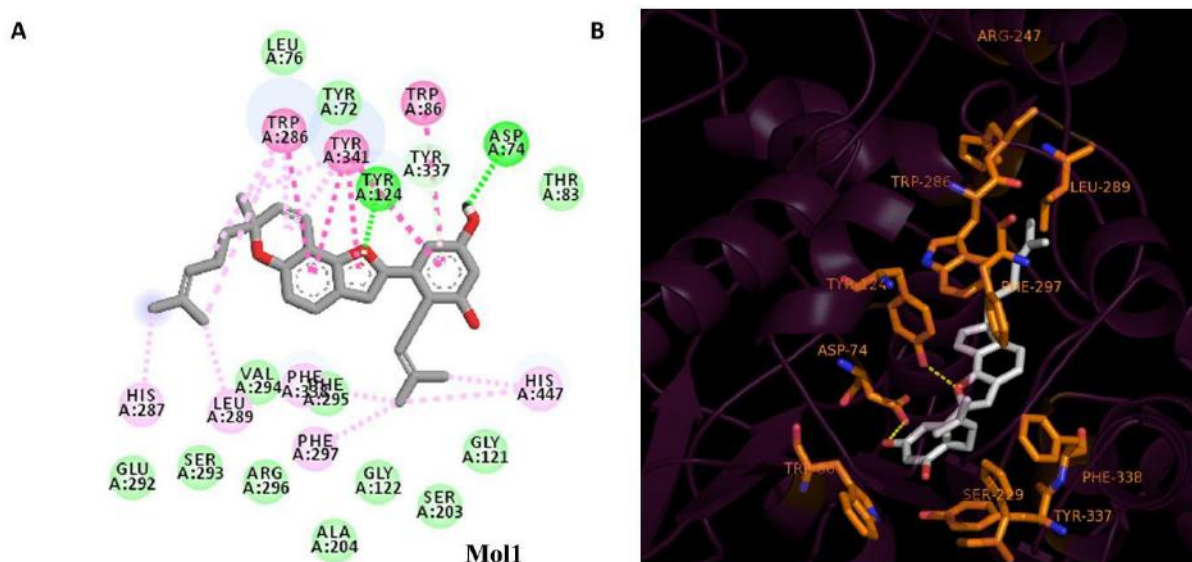


Figura 9: Interações observadas entre a Mol1 e a AChE no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e

B)- Principais interações.

Tabela 6: Interação da Mol1 com os Resíduos da AChE.

Resíduo de Aminoácido	Tipo de Interação
TYR124	Ligação de H
ASP74	Ligação de H
TYR124	Ligação de H
TYR337	Ligação de H
TRP286	Hidrofóbica
TYR337	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
TRP86	Hidrofóbica
LEU289	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
HIS287	Hidrofóbica
PHE297	Hidrofóbica
PHE338	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
HIS447	Hidrofóbica
HIS447	Hidrofóbica

A análise das interações observadas mostra que a Mol1 não preenche todo o *gorge* da AChE (Figura 9). Essa molécula é capaz de realizar vários contatos hidrofóbicos com resíduos aromáticos e, apesar de não interagir com a tríade catalítica por ligação de hidrogênio, consegue realizar contatos hidrofóbicos com HIS447 (Tabela 6).

O Gráfico 6 mostra o número de interações observadas entre a Mol1 e a AChE, por tipo.

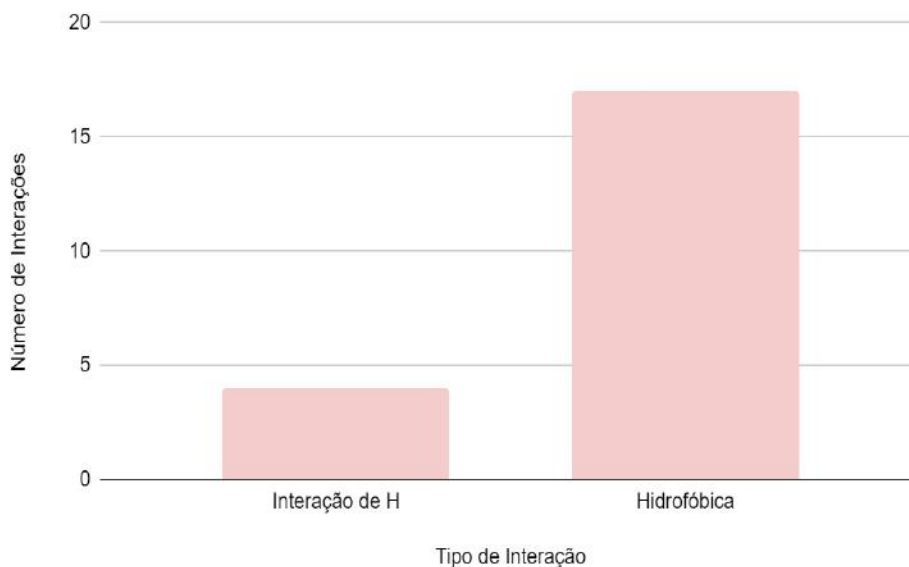


Gráfico 6: Número de interações observadas entre a Mol1 e a AChE no estudo de *docking*, por tipo.

Pela análise do Gráfico 6, é possível observar que o tipo de interação predominante da Mol1 com a enzima, é hidrofóbica, apesar de terem sido observadas ligações de hidrogênio. O Gráfico 7 mostra a frequência das interações observadas entre a Mol1 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido.

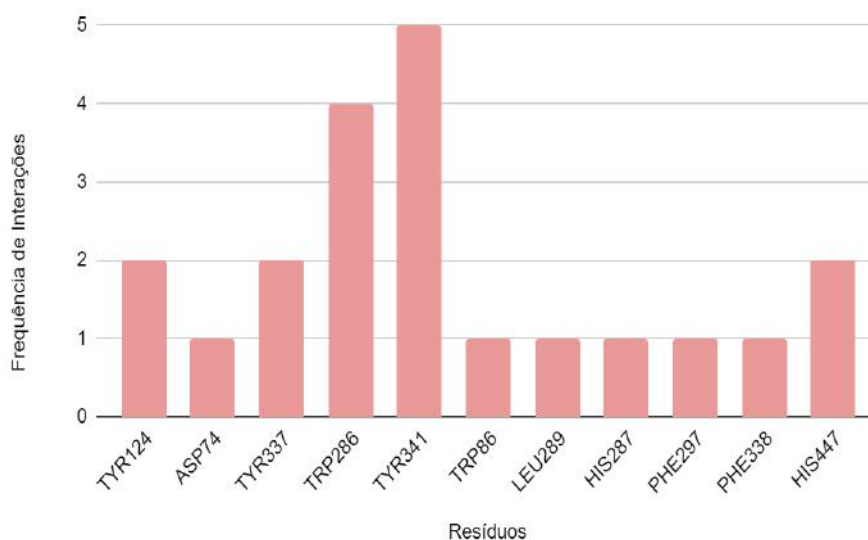


Gráfico 7: Frequência das interações observadas entre a Mol1 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido.

A Mol1 interage com onze resíduos diferentes. Em comum ao ligante donepezil co-cristalizado com a AChE, a Mol1 interagiu com: TYR337, TRP286, TYR341, TRP86, PHE338 e HIS447. Os resíduos com maior interação com a Mol1 foram: TRP286 e TYR341. O

donepezil também apresenta maior frequência de interações com os resíduos TRP286 e TRP341, ou seja, a Mol1 e o donepezil interagem com dois resíduos em comum com maior frequência.

5.1.3.1.3 Análise das Interações da Mol3 com a AChE

A Figura 10 e a Tabela 7 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol3 e a AChE.

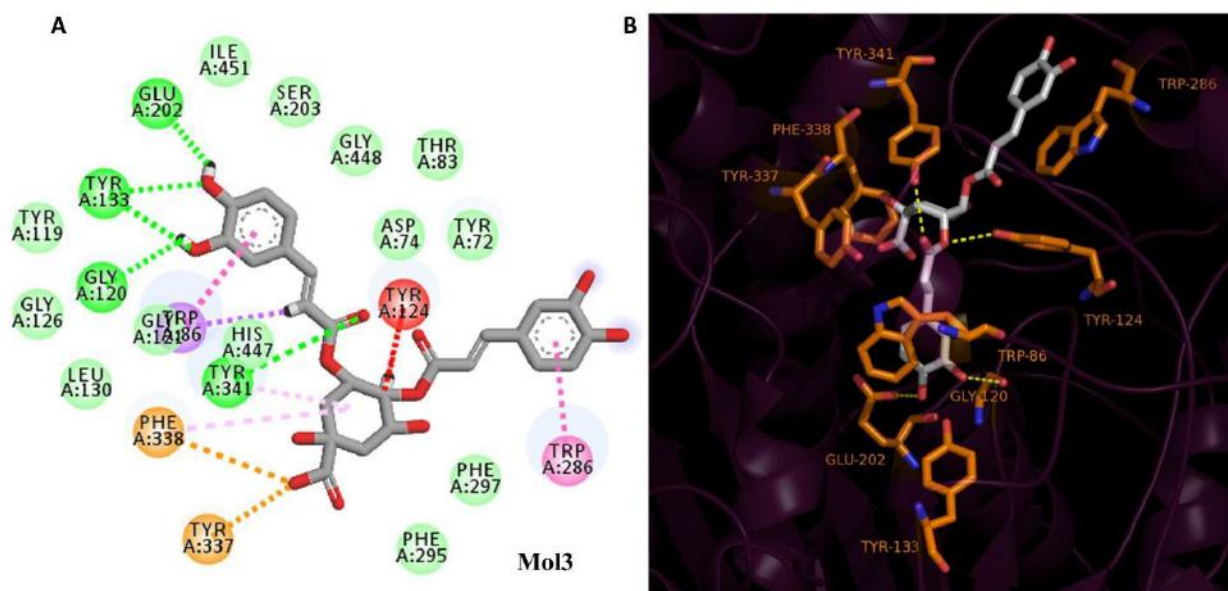


Figura 10: Interações observadas entre a Mol3 e a AChE no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.

Tabela 7: Interação da Mol3 com os Resíduos da AChE.

Resíduo de Aminoácido	Tipo de Interação
TYR133	Ligação de H
TYR133	Ligação de H
TYR341	Ligação de H
GLU202	Ligação de H
GLY120	Ligação de H
TYR337	Eletrostática
PHE338	Electrostática
TRP86	Hidrofóbica
TRP86	Hidrofóbica
TRP86	Hidrofóbica

TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica

A análise da Figura 10 e da Tabela 7 mostra que a Mol3 interage, principalmente, com resíduos de aminoácidos localizados no PAS. Suas hidroxilas catecólicas, entretanto, realizam interações por ligação de hidrogênio próximo ao sítio catalítico, especialmente com GLU202.

O Gráfico 8 mostra o número de interações observadas entre a Mol3 e a AChE, por tipo. É possível comprovar que o tipo de interação predominante, da Mol3 com a enzima, é por ligação de hidrogênio, o que a distingue das demais moléculas em estudo.

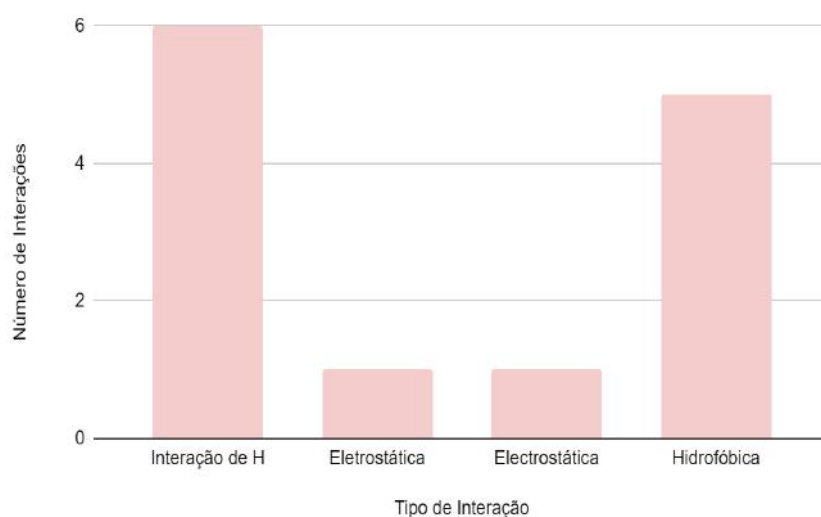


Gráfico 8: Número de interações observadas entre a Mol3 e a AChE no estudo de *docking*, por tipo.

O Gráfico 9 mostra Frequência das interações observadas entre a Mol3 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido.

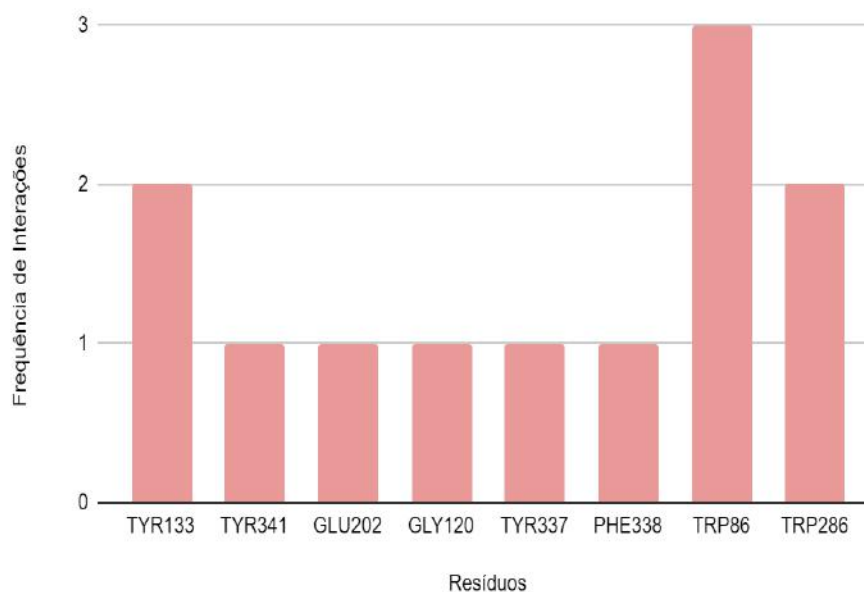


Gráfico 9: Frequência das interações observadas entre a Mol1 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido.

A Mol3 interage com oito resíduos diferentes. Em comum ao ligante donepezil cristalizado na AChE, a Mol3 interagiu com: TYR341, TYR337, PHE338, TRP86 e TRP286. Os resíduos com maior interação com a Mol3 foram: TYR133, TRP86 e TRP286. O donepezil também apresenta maior afinidade com o resíduo TRP86 e TRP286, ou seja, a Mol3 e o donepezil se ligam com maior afinidade (teórica) a dois resíduos em comum. Nesse sentido, conforme já descrito, essa molécula se destacou entre as outras, apresentando maior número de interações polares, além de interações importantes com resíduos aromáticos e outros, em comum com o donepezil. Esses dados podem estar correlacionados ao fato da Mol2 ser uma das moléculas potentes da série de PNs estudados e essa diferença talvez possa ser utilizada para discriminar moléculas mais ativas de menos ativas em estudos teóricos.

5.1.3.1.4 Análise das Interações da Mol5 com a AChE

A Figura 11 e a Tabela 8 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol5 e a AChE.

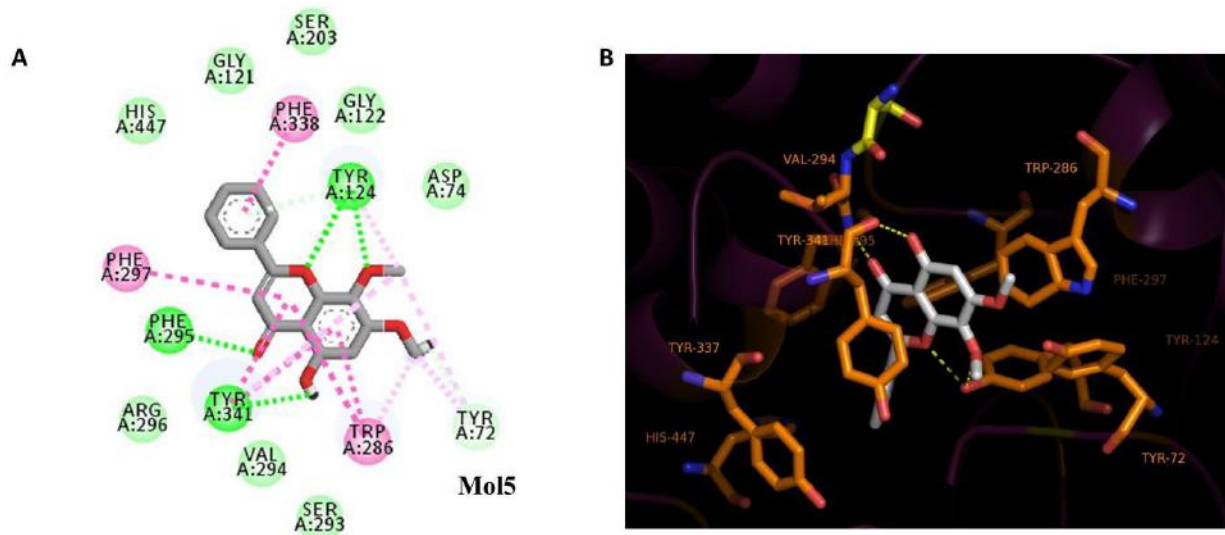


Figura 11: Interações observadas entre a Mol5 e a AChE no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.

Tabela 8. Interação da Mol5 com os Resíduos da AChE.

Resíduo de aminoácido	Tipo de Interação
TYR124	Ligação de H
TYR124	Ligação de H
PHE295	Ligação de H
TYR341	Ligação de H
TYR124	Ligação de H
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
PHE297	Hidrofóbica

Através da análise da Figura 11 e da Tabela 8, é evidente que, por ser uma molécula menor, Mol5 não preenche todo o gorge da AChE. Suas principais interações estão localizadas próximo à superfície do PAS e esta molécula não realiza interações no sítio catalítico.

O Gráfico 10 mostra o número de interações observadas entre a Mol5 e a AChE, por tipo, mais uma vez corroborando a observação de que o tipo de interação predominante com a

AChE é por interação hidrofóbica. Entretanto, esta molécula realiza também várias interações por ligação de hidrogênio, envolvendo o anel benzopirano. Essa é uma característica já mencionada anteriormente como provável marcador para justificar a potência dessa molécula comparado a Mol2, por exemplo, o que não foi evidenciado nos valores de *score* obtidos.

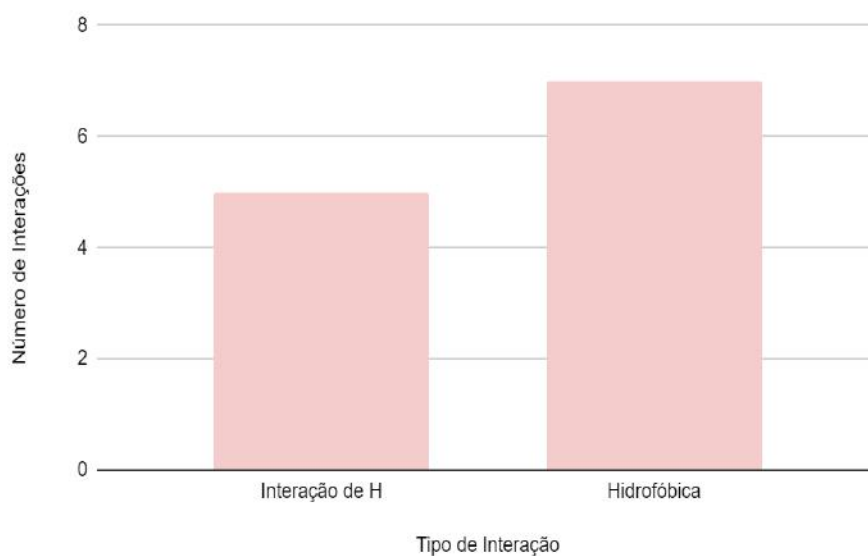


Gráfico 10: Número de interações observadas entre a Mol5 e a AChE no estudo de *docking*, por tipo.

O Gráfico 11 mostra Frequência das interações observadas entre a Mol5 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido. A Mol5 interage com cinco resíduos diferentes. Em comum ao ligante donepezil co-cristalizado com a AChE, a Mol5 interagiu com: PHE295, TYR341 e TRP286. Os resíduos com maior interação com a Mol5 foram: TYR124, TYR341 e TRP286. O donepezil também apresenta maior frequência de contatos com TYR341 e TRP286, ou seja, a Mol5 e o donepezil interagem com maior frequência com dois resíduos em comum.

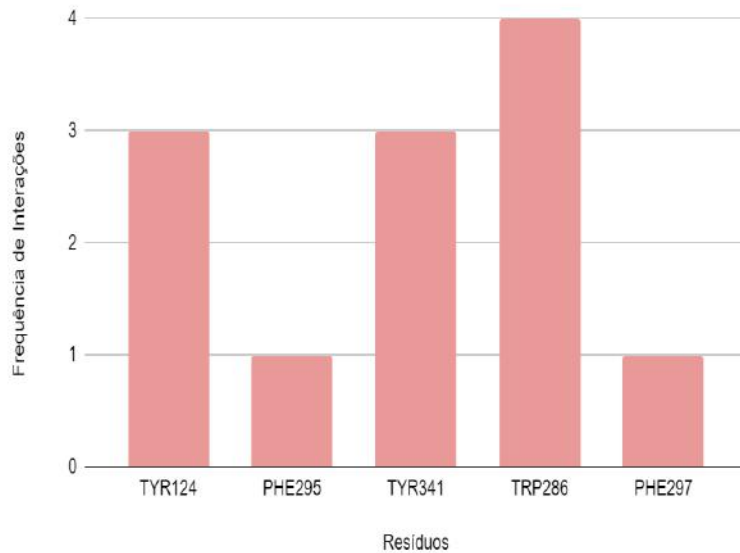


Gráfico 11: Frequência das interações observadas entre a Mol5 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido.

5.1.3.1.5 Análise das Interações da Mol4 com a AChE

A Figura 12 e a Tabela 9 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol4 e a AChE.

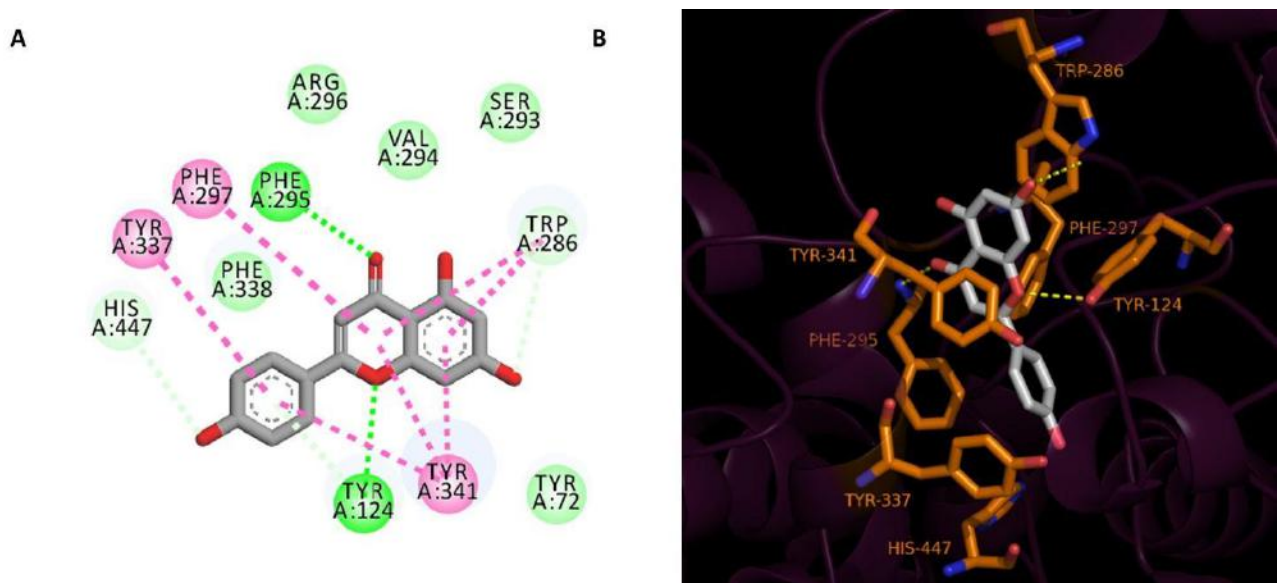


Figura 12: Interações observadas entre a Mol4 e a AChE no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.

Tabela 9. Interação da Mol4 com os Resíduos da AChE.

Resíduo de aminoácido	Tipo de Interação
TYR124	Ligação de H
PHE295	Ligação de H
HIS447	Ligação de H
TYR124	Ligação de H
TRP286	Ligação de H
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TRP286	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica
PHE297	Hidrofóbica
TYR337	Hidrofóbica
TYR341	Hidrofóbica

Mais uma vez, através da análise da Figura 12 e da Tabela 9 pode-se observar que Mol4 interage, principalmente, com resíduos do PAS, próximo à superfície do *gorge*. As interações por ligação de hidrogênio e hidrofóbicas auxiliam na ancoragem dessa molécula e ela não preenche todo o sítio, não tendo sido observadas interações significativas próximo à tríade catalítica.

O Gráfico 12 mostra o número de interações observadas entre a Mol4 e a AChE, por tipo. É possível observar que o tipo de interação predominante, da Mol4 com a enzima, é por interação hidrofóbica. Entretanto, conforme já observado, ela é capaz de realizar várias interações por ligação de hidrogênio. Esse dado parece corroborar ainda mais as observações anteriores de que as interações polares adicionais parecem estar correlacionadas à maior potência.

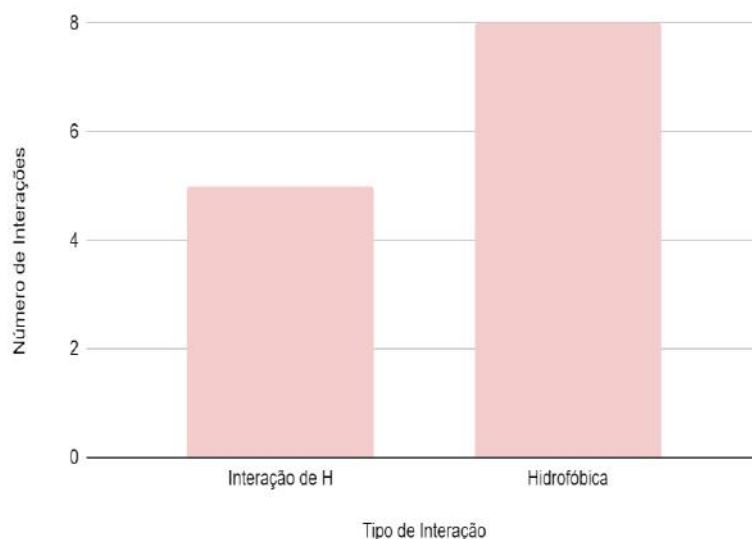


Gráfico 12: Número de interações observadas entre a Mol4 e a AChE no estudo de *docking*, por tipo.

O Gráfico 13 mostra Frequência das interações observadas entre a Mol4 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido.

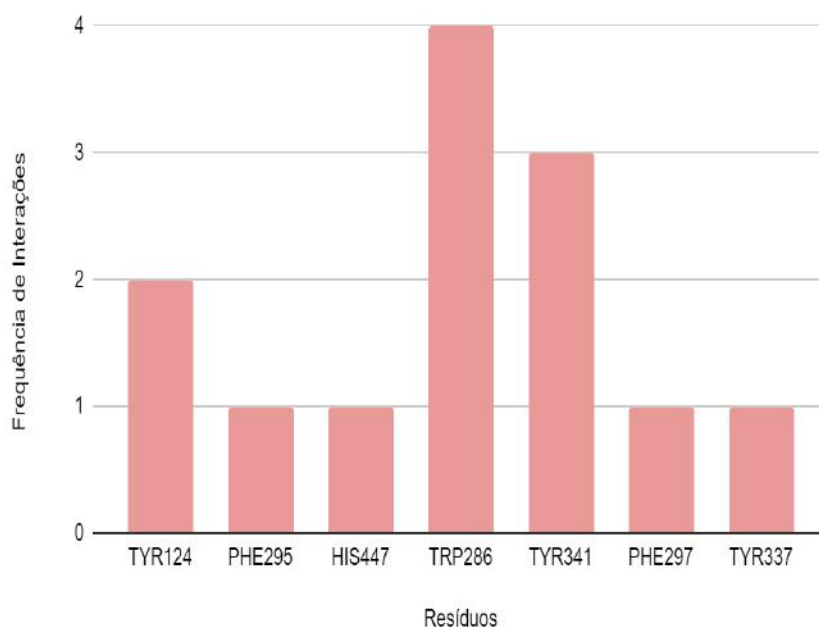


Gráfico 13: Frequência das interações observadas entre a Mol4 e a AChE no estudo de *docking*, por aminoácido.

A Mol4 interage com sete resíduos diferentes. Em comum ao ligante donepezil cristalizado na AChE, a Mol4 interagiu com: PHE295, HIS447, TRP286, TYR341 e TYR337. Os resíduos com maior interação com a Mol4 foram: TYR124, TRP86 e TYR341. O donepezil

também apresenta maior afinidade com o resíduo TRP286 e TYR341, ou seja, a Mol4 e o donepezil se ligam com maior afinidade a dois resíduos em comum.

5.1.4 Seleção da estrutura da HDAC6

Para a estrutura da HDAC, o PDB fornece mais de 320 estruturas, sendo 221 de organismos humanos. Com a resolução entre 2,0 e 2,5 Å, existem 40 estruturas. Destas, foi selecionada a estrutura 5EDU, por estar co-cristalizada com um PN potente, tricostatina A..

O programa Pymol foi utilizado para realizar a sobreposição das cadeias polipeptídicas A e B da HDAC6 (Figura 13), para verificar a correspondência entre as mesmas. Não houve distorção considerável entre as estruturas (RMSD= 1,2 Å) como, também, nas conformações das cadeias laterais dos resíduos do sítio ativo das enzimas. Então, a estrutura foi considerada apta para a triagem virtual com os ligantes propostos.



Figura 13: Sobreposição das cadeias A (verde) e B (azul) da HDAC6 (código PDB: 5EDU).

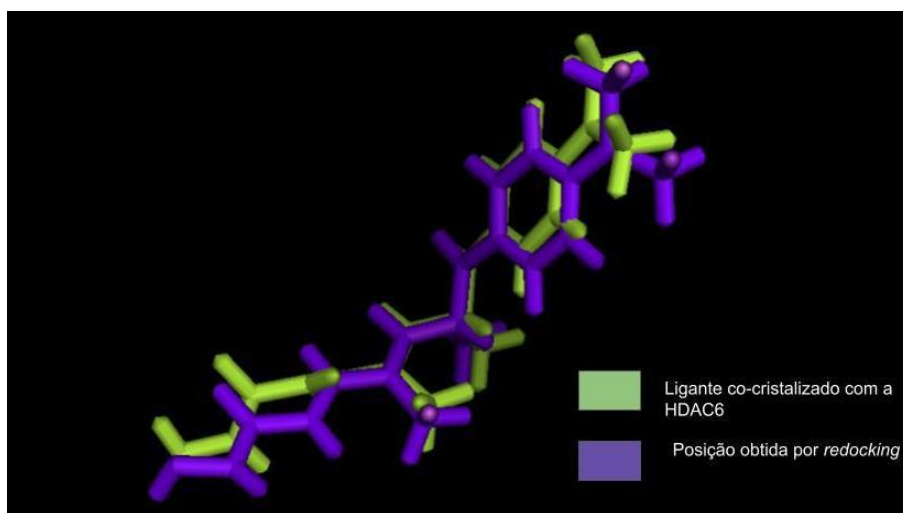


Figura 14: Sobreposição do ligante co-cristalizado com a HDAC6 e melhor pose obtida por *redocking* com a função de *scoreChemPLP* e raio de 15Å.

A correspondência entre as estruturas também foi verificada pelo cálculo do desvio médio quadrático (RMSD), que indica o grau de semelhança entre as estruturas sobrepostas, no caso, o valor correspondente foi 0,001 Å (Figura 14); indicando um alto grau de semelhança. Existe um grau de semelhança entre a tricostatina A co-cristalizada na enzima e a tricostatina do *redocking*, porém é possível observar diferenças na conformação da estrutura. Ainda assim, foi possível encontrar a pose experimental (Figura 14).

A Figura 15 e a Tabela 10 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da tricostatina A e a HDAC6. O íon Zn^{2+} reside na base de um canal de cerca de 10 Å e interage com a tricostatina A por coordenação com o grupo funcional hidroxilamina.

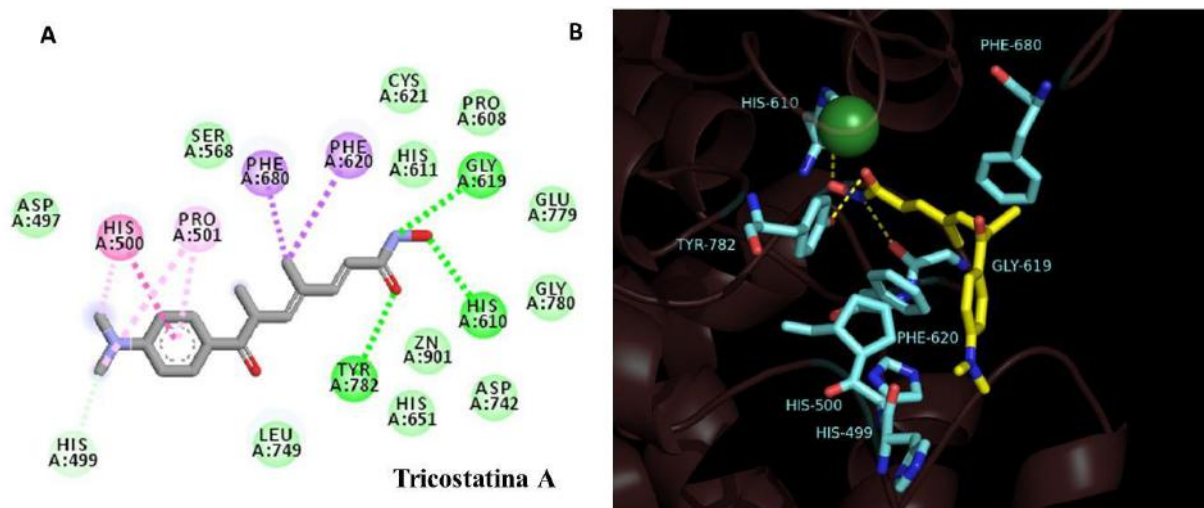


Figura 15: Interações observadas entre a Tricostatina A e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.

Tabela 10. Interação da Tricostatina A com os Resíduos da HDAC6.

Resíduo de aminoácido	Tipo de Interação
TYR782	Ligação de H
GLY619	Ligação de H
HIS610	Ligação de H
HIS499	Ligação de H
PHE620	Hidrofóbica
PHE680	Hidrofóbica
HIS500	Hidrofóbica
PHE680	Hidrofóbica
PRO501	Hidrofóbica

O Gráfico 14 mostra o número de interações observadas entre a tricostatina A e a HDAC6, por tipo. É possível observar que o tipo de interação predominante é a hidrofóbica.

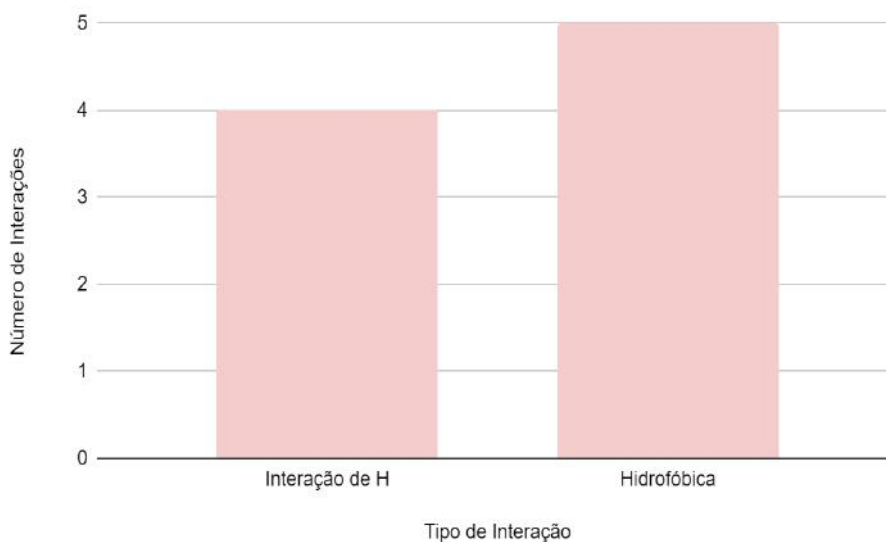


Gráfico 14: Número de interações observadas entre a tricostatina A e a HDAC6 no estudo de *docking*, por tipo.

O Gráfico 15 mostra Frequência das interações observadas entre a tricostatina A e a HDAC6 no estudo de *docking*, por aminoácido.

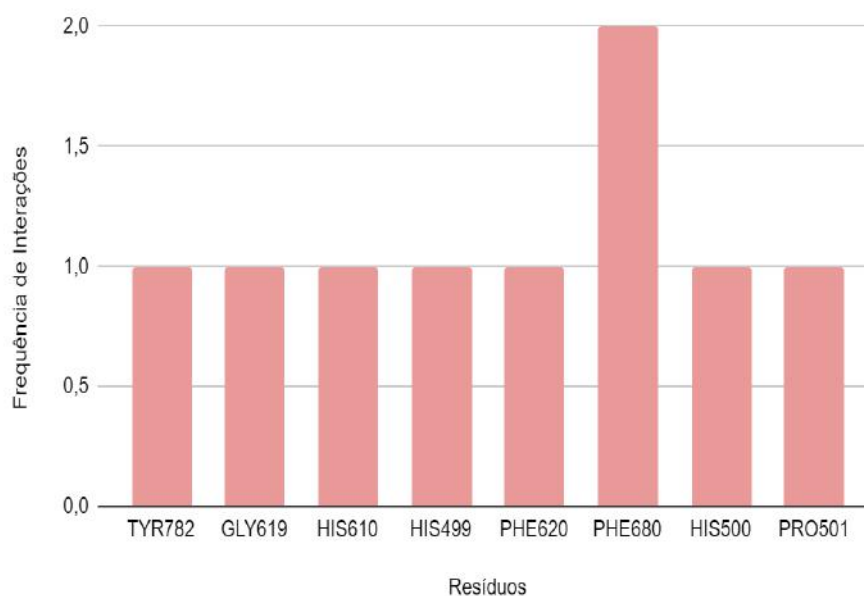


Gráfico 15: Frequência das interações observadas entre a tricostatina A e a HDAC6 no estudo de *docking*, por aminoácido.

Pela análise do gráfico 15, O resíduo do sítio da HDAC mais envolvido nas interações com a tricostatina é a PHE680.

5.1.4.1 Docking dos PNs Selecionados com a HDAC6

Ao realizar uma análise prévia dos resultados de *docking* molecular entre a HDAC6 humana, o seu ligante e as moléculas estudadas, indicam valores de *score* maiores para a Tricostatina, Mol1, Mol2 e Mol3. Conforme os valores, a afinidade teórica pela enzima HDAC6 do ligante co-cristalizado é menor quando comparada a Mol2, candidata a inibidora de AChE. Ao compararmos todas as cinco moléculas, notamos uma maior afinidade teórica entre a Mol1, Mol2 e Mol3 com a enzima, enquanto que a menor afinidade teórica foi observada para Mol4 e Mol5 (Gráfico 16).

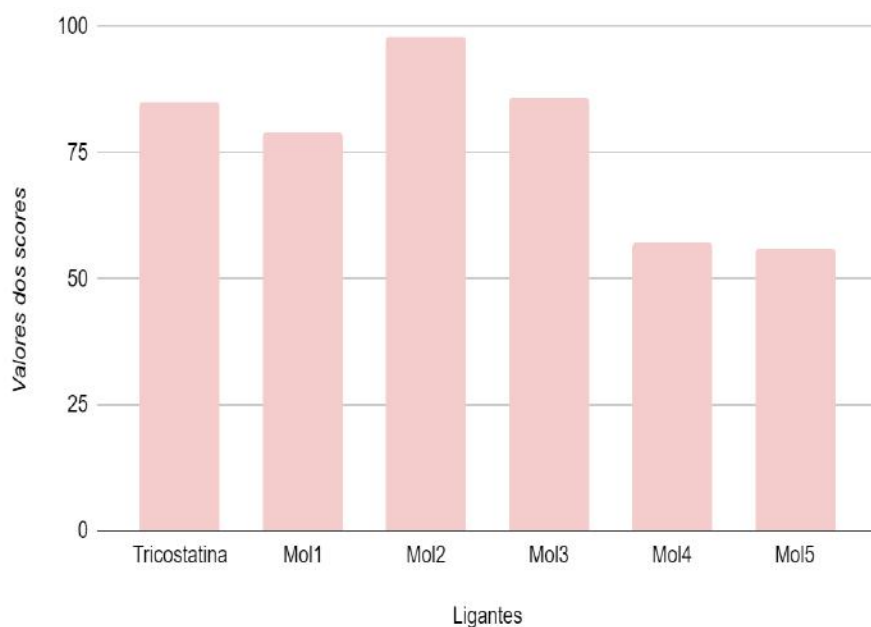


Gráfico 16: Valores de score (CHEMPLP) observados para Mol1-5, tricostatina A e a HDAC6 no estudo de *docking*.

5.1.4.1.1 Docking da Mol2 com a HDAC6

A Figura 16 e a Tabela 11 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol2 e a HDAC6.

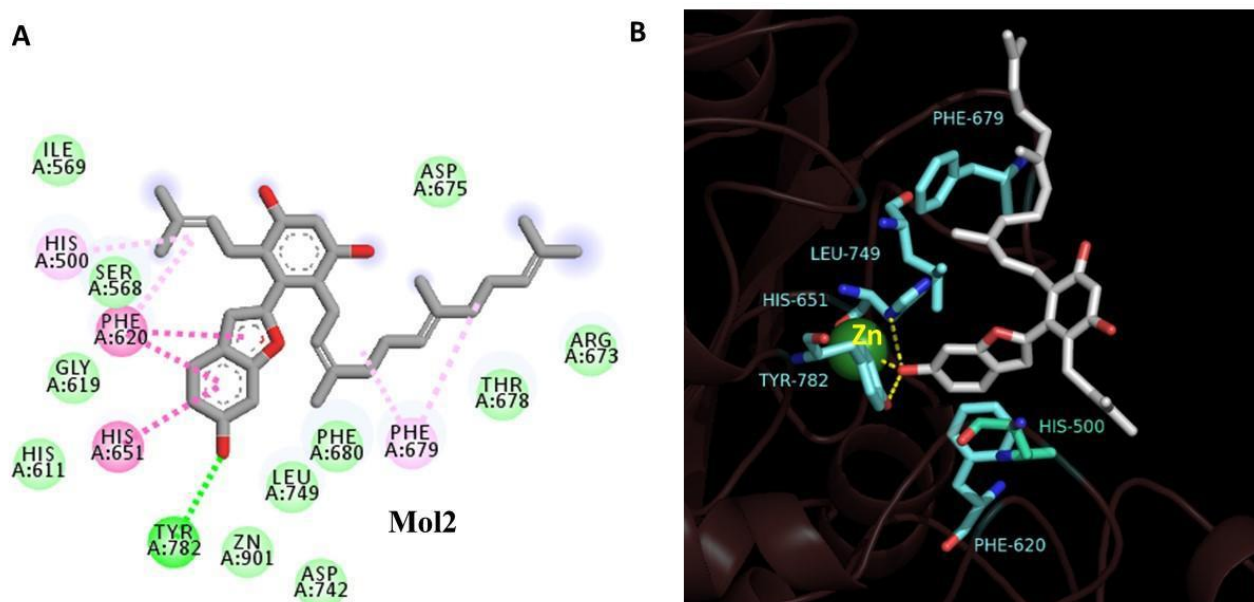


Figura 16: Interações observadas entre a Mol2 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.

Tabela 11. Interação da Mol2 com os Resíduos da HDAC6.

Resíduo de Aminoácido	Tipo de Interação
TYR782	Ligação de H
PHE620	Hidrofóbica
PHE620	Hidrofóbica
HIS651	Hidrofóbica
LEU749	Hidrofóbica
HIS500	Hidrofóbica
HIS651	Hidrofóbica
PHE679	Hidrofóbica
PHE679	Hidrofóbica

O tipo de interação entre o ligante Mol2 e a enzima foi em sua maioria de caráter hidrofóbico. A Mol2 interage, também com o zinco através de coordenação com a hidroxila ligada ao anel benzofurano. Ressalta-se que essa molécula realiza poucas ligações de hidrogênio, envolvendo principalmente a hidroxila ligada ao anel benzofurano.

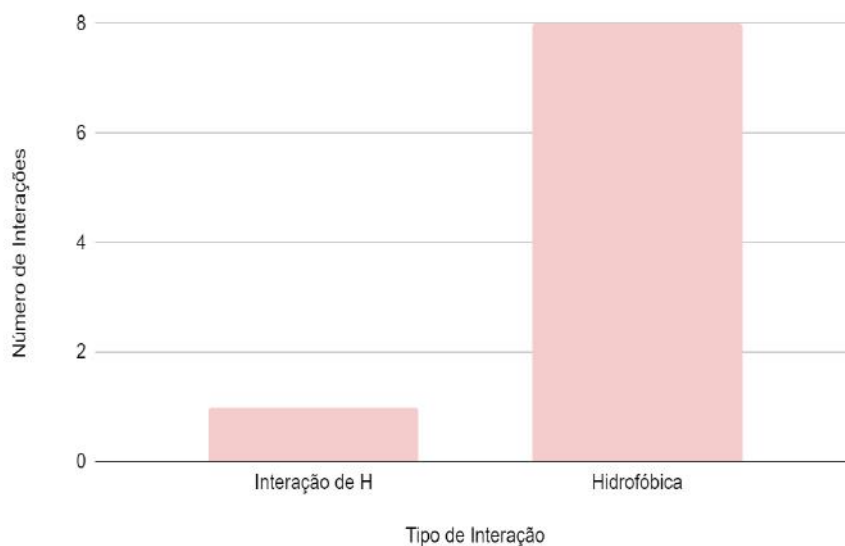


Gráfico 17: Número de interações observadas entre a Mol2 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por tipo.

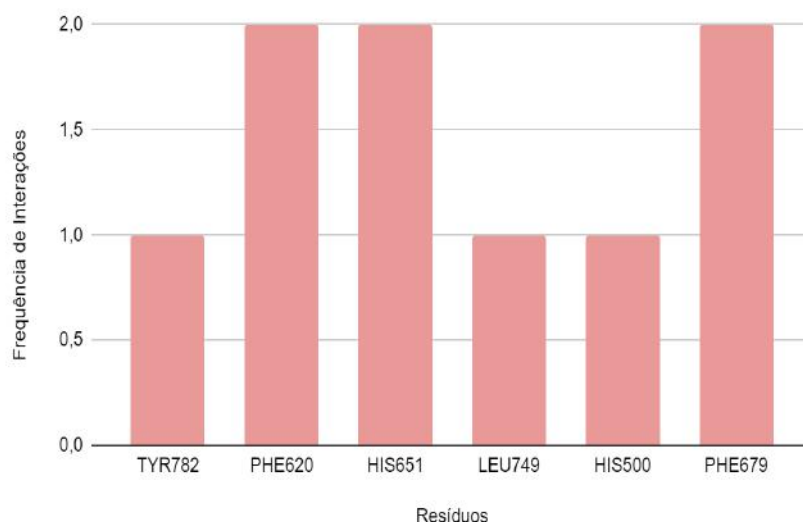


Gráfico 18: Frequência das interações observadas entre a Mol2 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por aminoácido.

No sítio de ligação, a Mol2 interagiu com seis resíduos diferentes, mas os que mais interagiram foram: PHE620, HIS651 e PHE679. Comparando os resíduos que interagiram com a Tricostatina A e com a Mol2, temos: TYR82, PHE620 e HIS500, além de coordenação com o átomo de Zinco catalítico.

5.1.4.1.2 Docking da Mol3 com a HDAC6

A Figura 17 e a Tabela 12 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol3 e a HDAC6.

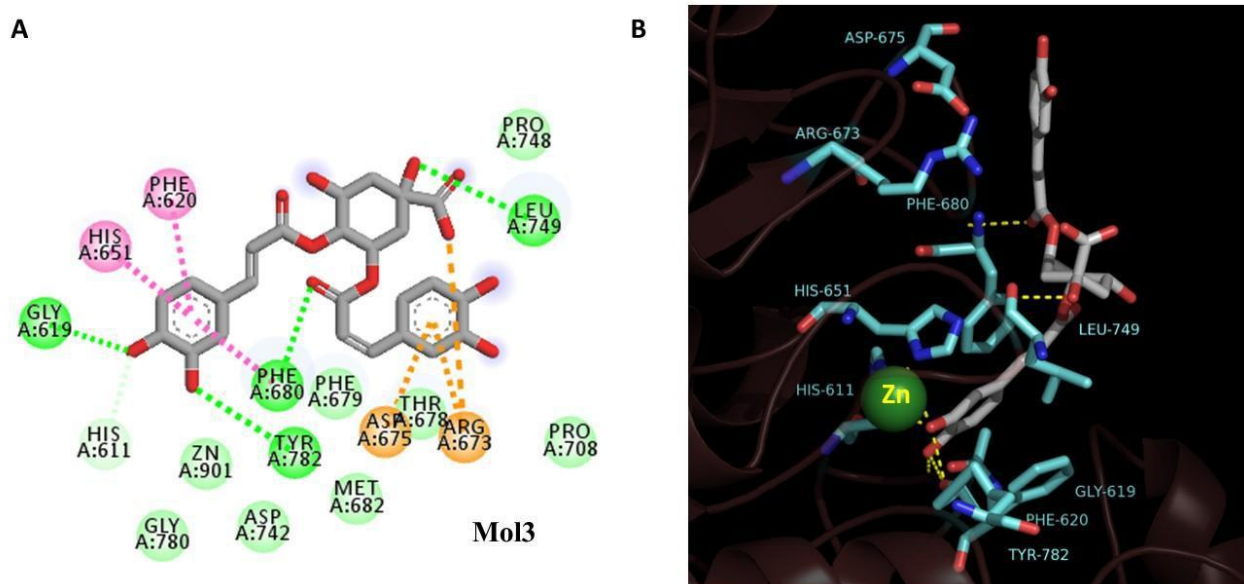


Figura 17: Interações observadas entre a Mol3 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e

B)- Principais interações.

Tabela 12. Interação da Mol3 com os Resíduos da HDAC6.

Resíduo de aminoácido	Tipo de Interação
ARG673	Eletrostática
PHE680	Ligação de H
TYR782	Ligação de H
GLY619	Ligação de H
LEU749	Ligação de H
HIS611	Ligação de H
ARG673	Eletrostática
ASP675	Eletrostática
PHE620	Hidrofóbica
PHE680	Hidrofóbica
HIS651	Hidrofóbica

As interações predominantes foram por ligação de hidrogênio, o que está relacionado ao número de aminoácidos polares no sítio ativo da HDAC6 e às hidroxilas presentes nos anéis fenila de Mol3. As hidroxilas catecólicas que também interagiram com o átomo de Zn presente no sítio ativo da enzima por van der Waals (Gráfico 19).

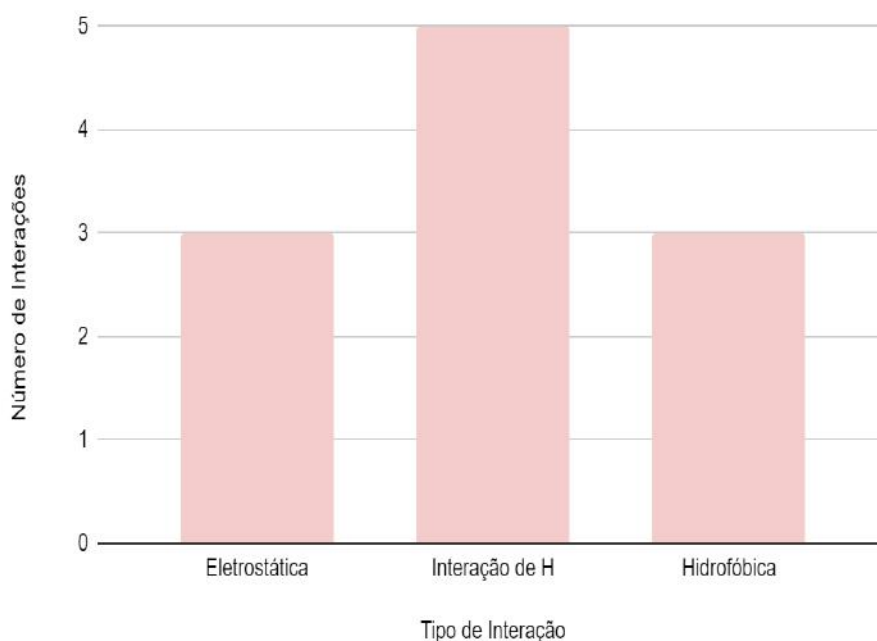


Gráfico 19. Número de interações observadas entre a Mol3 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por tipo.

Pela análise do Gráfico 20, a Mol3 interage no sítio da HDAC6 com nove resíduos diferentes, tendo mais interações com ARG673 e PHE680. Os resíduos que o ligante tricostatina e a Mol3 interagiram em comum foram: PHE680, TYR782, GLY619 e PHE620, vale ressaltar que ambos os ligantes interagiram com maior frequência com o resíduo PHE680.

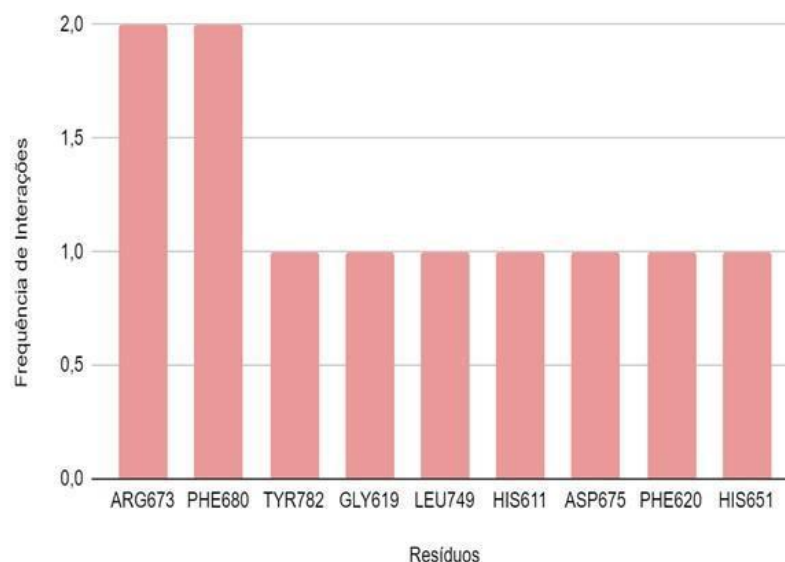


Gráfico 20. Frequência das interações observadas entre a Mol3 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por aminoácido.

5.1.4.1.3 Docking da Mol1 com a HDAC6

A Figura 18 e a Tabela 13 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol1 e a HDAC6.

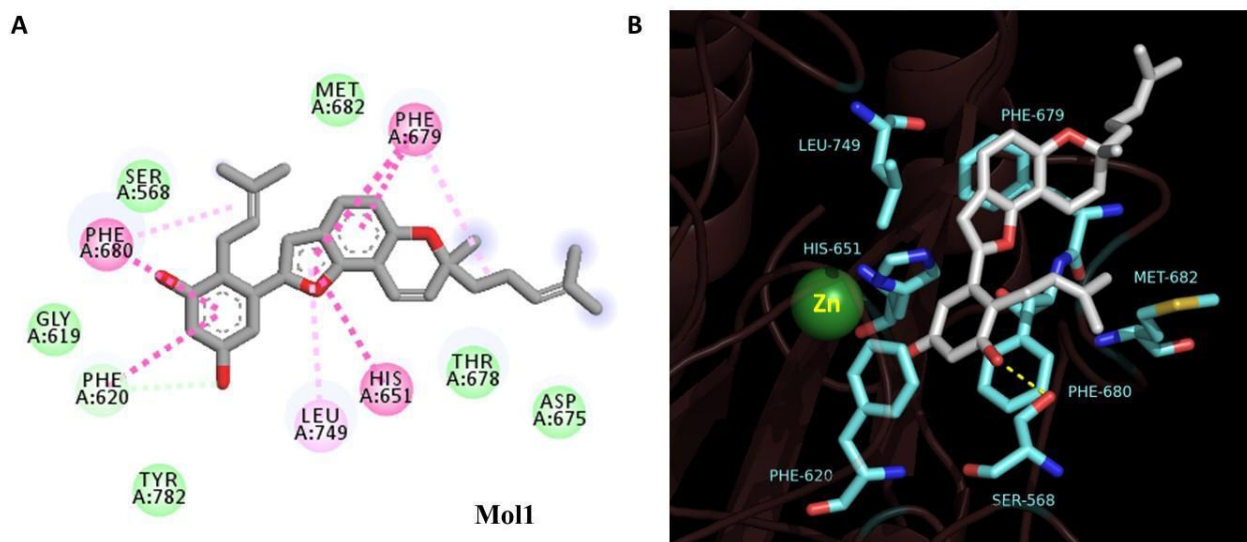


Figura 18: Interações observadas entre a Mol1 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e

B)- Principais interações.

Tabela 13. Interação da Mol1 com os Resíduos da HDAC6.

Resíduo de aminoácido	Tipo de Interação
PHE620	Ligação de H
PHE620	Hidrofóbica
PHE679	Hidrofóbica
PHE680	Hidrofóbica
PHE679	Hidrofóbica
HIS651	Hidrofóbica
MET682	Hidrofóbica
PHE679	Hidrofóbica
PHE680	Hidrofóbica
PHE680	Hidrofóbica
LEU749	Hidrofóbica

Os dados acima mostram que a Mol1 apresentou mais interações hidrofóbicas com os resíduos da enzima HDAC6. Isso é corroborado pela análise do número dos tipos de interação observados no *docking* (Gráfico 21). Não foi observada nenhuma coordenação com o átomo de Zn do sítio ativo da HDAC6, apenas interações de van der Waals.

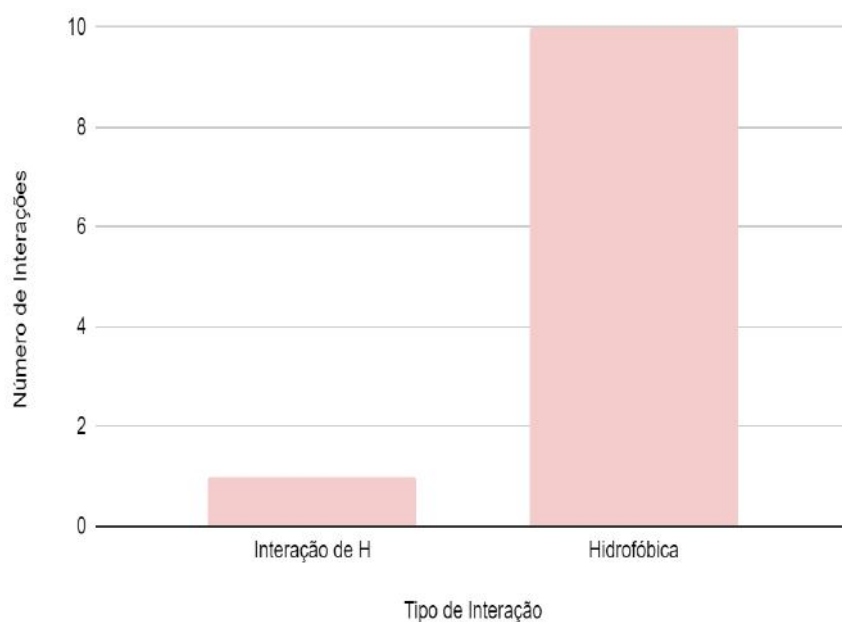


Gráfico 21. Número de interações observadas entre a Mol1 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por

tipo.

Pelo Gráfico 22, observa-se que a Mol1 interage com seis resíduos diferentes e apresenta mais interações com a PHE679 e PHE680. Os resíduos que aparecem também nas interações com a tricostatina são: PHE620 e PHE680; sendo o resíduo PHE680 com maior frequência de interação com ambos os ligantes.

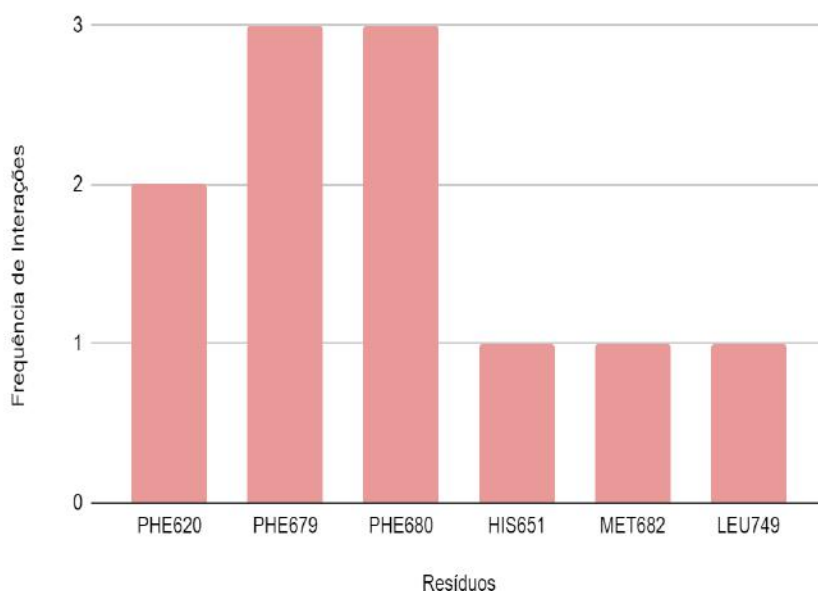


Gráfico 22. Frequência das interações observadas entre a Mol1 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por aminoácido.

5.1.4.1.4 Docking da Mol4 com a HDAC6

A Figura 19 e a Tabela 14 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol4 e a HDAC6.

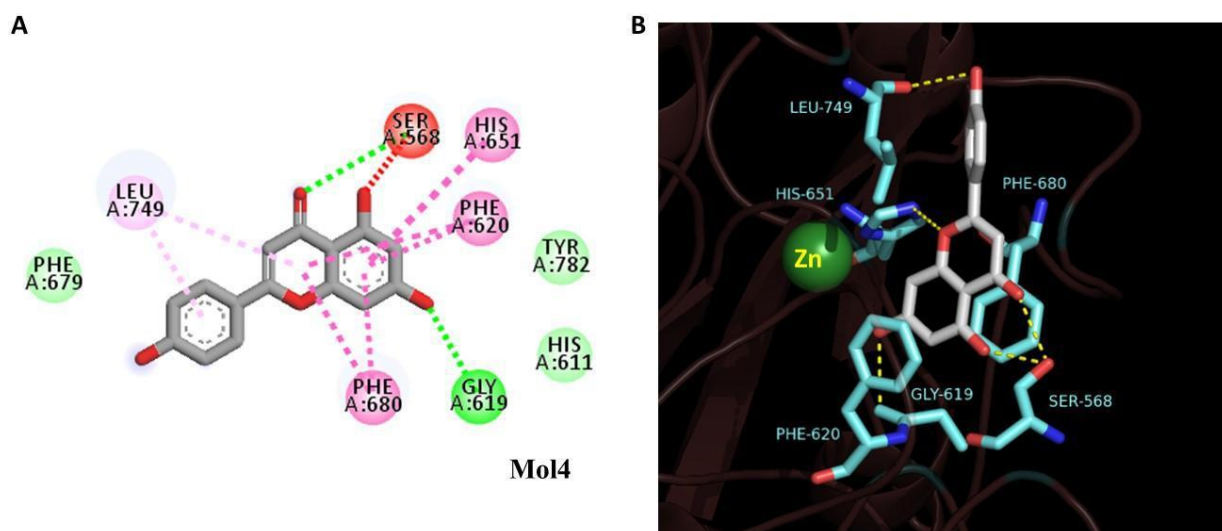


Figura 19: Interações observadas entre a Mol4 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.

Tabela 14. Interação da Mol4 com os Resíduos da HDAC6.

Resíduo de aminoácido	Tipo de Interação
SER568	Ligação de H
GLY619	Ligação de H
PHE620	Hidrofóbica
PHE620	Hidrofóbica
PHE680	Hidrofóbica
PHE680	Hidrofóbica
HIS651	Hidrofóbica
LEU749	Hidrofóbica
LEU749	Hidrofóbica

Nessa análise, observa-se que a Mol4 teve mais interações hidrofóbicas no sítio de ligação da HDAC6. Não foi observada nenhuma interação com o átomo de Zn do sítio ativo, que está distante da molécula. Entretanto, a molécula faz ligação de hidrogênio e contatos hidrofóbicos com o resíduo catalítico, HIS651. O Gráfico 23 corrobora adicionalmente essas observações.

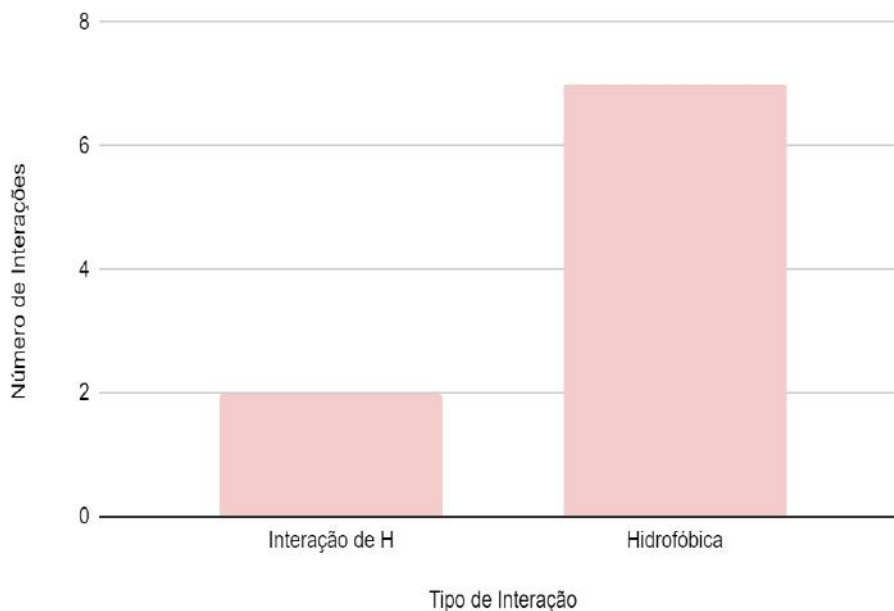


Gráfico 23. Número de interações observadas entre a Mol4 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por tipo.

Pela análise do Gráfico 24, observa-se que Mol4 interagiu com seis resíduos diferentes, os resíduos PHE620, PHE680 e LEU749 interagiram mais vezes com a molécula. A Tricostatina e a Mol4 interagiram com maior frequência com três resíduos em comum, sendo: GLY619, PHE620 e PHE680.

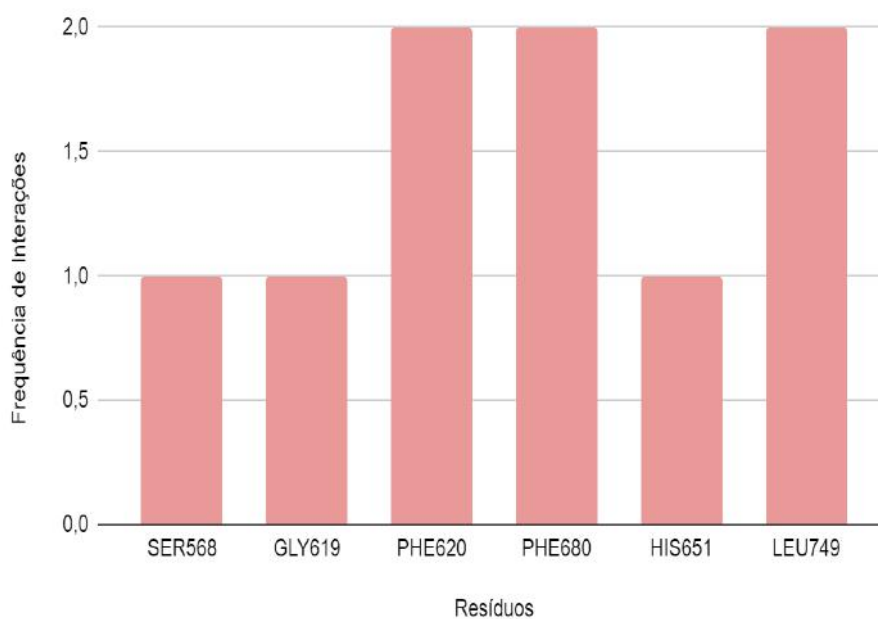


Gráfico 24. Frequência das interações observadas entre a Mol4 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por aminoácido.

5.1.4.1.5 Docking da Mol5 com a HDAC6

A Figura 20 e a Tabela 15 mostram as principais interações, assim como os seus tipos, observadas no estudo de *docking* da Mol5 e a HDAC6.

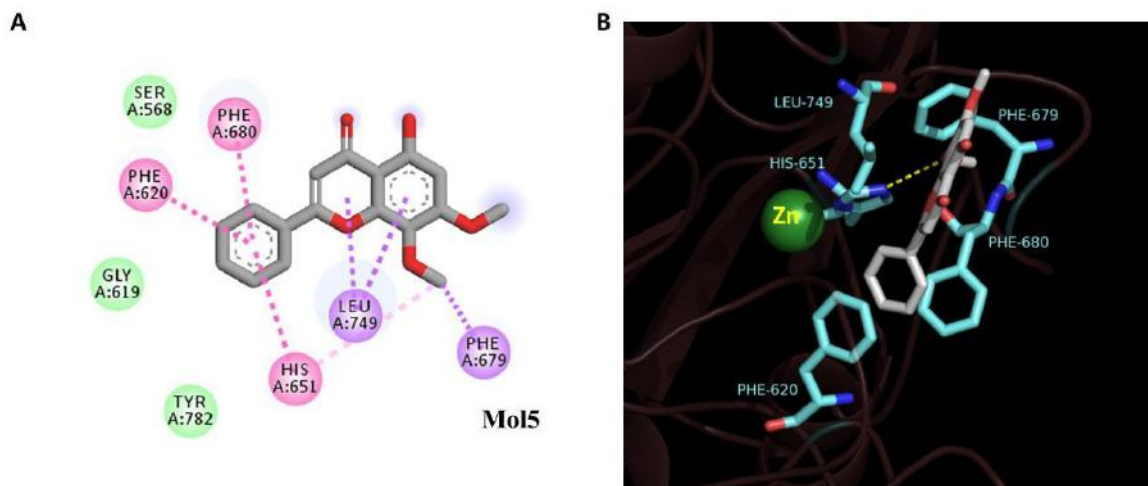


Figura 20: Interações observadas entre a Mol5 e a HDAC6 no estudo de *docking*. A)- Diagrama 2D e B)- Principais interações.

Diferentemente das outras moléculas analisadas, a Mol5 só interagiu com sítio da HDAC6 com interações hidrofóbicas pela análise no Discovery Studio. Entretanto, a análise do Pymol sugere uma ligação de hidrogênio apenas, com o resíduo de aminoácido catalítico, HIS651 (Figura 20, B). Para essa molécula, também não foi observada nenhuma interação com o átomo de Zn do sítio ativo.

Tabela 15. Interação da Mol5 com os Resíduos da HDAC6.

Resíduo de aminoácido	Tipo de Interação
LEU749	Hidrofóbica
LEU749	Hidrofóbica
PHE679	Hidrofóbica
PHE620	Hidrofóbica
PHE680	Hidrofóbica
HIS651	Hidrofóbica

A análise mencionada é corroborada pelo Gráfico 25, o qual mostra apenas interações hidrofóbicas para Mol5.

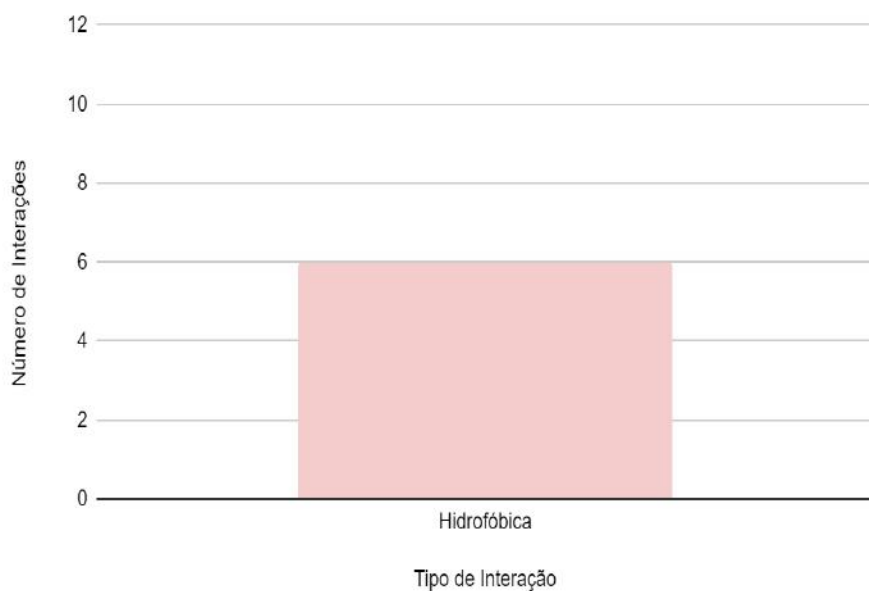


Gráfico 25. Número de interações observadas entre a Mol5 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por tipo.

O gráfico 26 mostra que a Mol5 interagiu com 5 resíduos diferentes. Entretanto, apenas o resíduo LEU749 apresentou mais de uma interação. Em comum com o ligante co-cristalizado, a Mol5 interagiu com os resíduos PHE620 e PHE680.

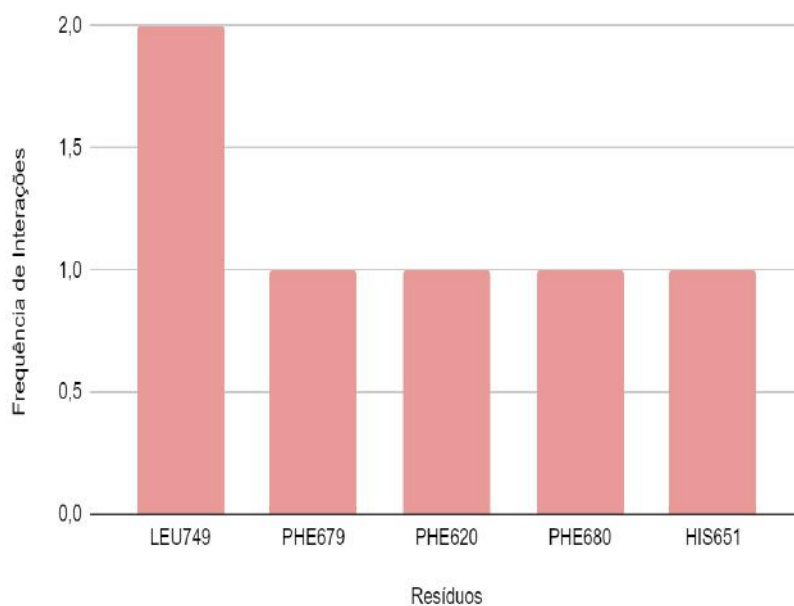


Gráfico 26. Frequência das interações observadas entre a Mol5 e a HDAC6 no estudo de *docking*, por aminoácido.

6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados com a AChE e os PNs não foi capaz de hierarquizar as moléculas pela função de *score* utilizada. Entretanto, a análise das interações realizadas por tipo, número e frequência pode ser utilizada como indicativo de maior afinidade teórica com a enzima em estudo;

Ainda com a AChE, a molécula menos potente, Mol2, apresentou maior valor de *score*, o que indica a superestimativa das contribuições das interações hidrofóbicas para a afinidade de ligação teórica com a função utilizada, a CHEMPLP;

Nos estudos com a HDAC, há um indicativo de que as moléculas capazes de realizar maior número de interações polares podem ter maior afinidade;

Em especial, as moléculas que interagiram com o átomo de Zinco no sítio ativo da HDAC6, obtiveram maior *score*. Essa interação é importante para a inibição da atividade catalítica dessa isoforma, dependente de Zn;

Pela análise geral, pode-se indicar Mol1 e Mol3 como potenciais moléculas Multi-Alvo, inibidores de AChE e HDAC6, através do seu perfil teórico de interações com esses dois alvos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, Claudia *et al.* From combinations to multitarget-directed ligands: A continuum in Alzheimer's disease polypharmacology. **Medicinal Research Reviews**, v. 41, n. 5, p. 2606-2633, 2021.
- ANWAR, Shehata; PONS, Vincent; RIVEST, Serge. Microglia purinoceptor P2Y6: Um alvo terapêutico emergente em doenças do SNC. **Células**, v. 9, n. 7, pág. 1595, 2020.
- ARYA, Ashwani *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitory Potential of Various Sesquiterpene Analogues for Alzheimer's Disease Therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 3, p. 350, 2021.
- ARYA, Ashwani *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitory Potential of Various Sesquiterpene Analogues for Alzheimer's Disease Therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 3, p. 350, 2021.
- BONDAREV, Andrey D. *et al.* Recent developments of HDAC inhibitors: Emerging indications and novel molecules. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2021.
- BUI, Thanh Tung; NGUYEN, Thanh Hai. Natural product for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 413-423, 2017.
- CAO, Jiqing *et al.* Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Molecular neurodegeneration**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 2018.

- CUMMINGS, Jeffrey *et al.* Pipeline de desenvolvimento de drogas para a doença de Alzheimer: 2018. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions** , v. 4, n. 1, pág. 195-214, 2018.
- CUMMINGS, Jeffrey *et al.* Pipeline de desenvolvimento de drogas para a doença de Alzheimer: 2020. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions** , v. 6, n. 1, pág. e12050, 2020.
- DE FALCO, Anna *et al.* Alzheimer's disease: etiological hypotheses and treatment perspectives. **Quimica Nova**, v. 39, n. 1, p. 63-80, 2016.
- DENG, Yin-Hua *et al.* Multi-target screening and experimental validation of natural products from selaginella plants against Alzheimer's disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 539, 2017.
- FERREIRA, João PS *et al.* Compostos de alvo duplo para a doença de Alzheimer: inibidores duplos de AChE e BACE-1 naturais e sintéticos e sua relação estrutura-atividade (SAR). **European Journal of Medicinal Chemistry** , p. 113492, 2021.
- GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, mar. 2014.
- H FERREIRA-VIEIRA, Talita *et al.* Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. **Current neuropharmacology**, v. 14, n. 1, p. 101-115, 2016.
- HAI, Y., & Christianson, D. W. (2016). Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nature chemical biology*, 12(9), 741–747.
- HANSEN, Richard A. *et al.* Eficácia e segurança do donepezil, galantamina e rivastigmina para o tratamento da doença de Alzheimer: uma revisão sistemática e meta-análise. **Intervenções clínicas no envelhecimento** , v. 3, n. 2, pág. 211, 2008.
- IMBIMBO, Bruno P. *et al.* Accelerating Alzheimer's disease drug discovery and development: what's the way forward?. **Expert Opinion on Drug Discovery**, p. 1-9, 2021.
- IQBAL, Khalid *et al.* Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. **Current Alzheimer Research**, v. 7, n. 8, p. 656-664, 2010.
- KAPLAN, Warren; LAING, Richard. Background Paper 2 2013 Update: Background to Priority Medicines for Europe and the World Report.
- KINNEY, Jefferson W. *et al.* Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 4, p. 575-590, 2018.

- 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, n. 20, p. 5851–5855, out. 2006.
- LONSKAYA, Irina *et al.* Nilotinib-induced autophagic changes increase endogenous parkin level and ubiquitination, leading to amyloid clearance. **Journal of molecular medicine**, v. 92, n. 4, p. 373-386, 2014.
- MARAMAI, Samuele *et al.* Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer’s disease: Review on emerging target combinations. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.
- MELO, Simone Cecília de *et al.* Dementias in Brazil: increasing burden in the 2000–2016 period. Estimates from the Global Burden of Disease Study 2016. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 78, p. 762-771, 2020.
- NOORI, Tayebah *et al.* Role of natural products for the treatment of Alzheimer's disease. **European journal of pharmacology**, p. 173974, 2021.
- ONISHI, Tomohiro *et al.* Um novo inibidor de HDAC6 oralmente ativo T-518 mostra um potencial terapêutico para a doença de Alzheimer e tauopatia em camundongos. **Relatórios científicos**, v. 11, n. 1, pág. 1-11, 2021.
- PANCHE, A. N., Chandra, S., & Diwan, A. D. (2019). Multi-Target β -Protease Inhibitors from *Andrographis paniculata*: In Silico and In Vitro Studies. **Plants (Basel, Switzerland)**, 8(7), 231.
- PAUDEL, P., Seong, S. H., Zhou, Y., Ha, M. T., Min, B. S., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2019). Arylbenzofurans from the Root Bark of *Morus alba* as Triple Inhibitors of Cholinesterase, β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1, and Glycogen Synthase Kinase-3 β : Relevance to Alzheimer's Disease. **ACS omega**, 4(4), 6283–6294.
- PICCIRILLO, Erika; AMARAL, Antonia Tavares do. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, v. 41, p. 662-677, 2018.
- SHAL, Bushra *et al.* Anti-neuroinflammatory potential of natural products in attenuation of Alzheimer's disease. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 548, 2018.
- SHUKLA, Surabhi; TEKWANI, Babu L. Histone deacetylases inhibitors in neurodegenerative diseases, neuroprotection and neuronal differentiation. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 537, 2020.
- SILVA, Marcos Vinícius Ferreira *et al.* Alzheimer’s disease: risk factors and potentially protective measures. **Journal of biomedical science**, v. 26, n. 1, p. 1-11, 2019.

- SIMÕES-PIRES, Claudia *et al.* HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: what makes it different from the other HDACs?. **Molecular neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2013.
- THAL, Dietmar Rudolf; FÄNDRICH, Marcus. Agregação de proteínas na doença de Alzheimer: A β e τ e seus papéis potenciais na patogênese da DA. 2015
- TÖNNIES, Eric; TRUSHINA, Eugenia. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, n. 4, p. 1105-1121, 2017.
- VAISERMAN, Alexander; KOLIADA, Alexander; LUSHCHAK, Oleh. Neuroinflammation in pathogenesis of Alzheimer's disease: Phytochemicals as potential therapeutics. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 189, p. 111259, 2020.
- VAISERMAN, Alexander; KOLIADA, Alexander; LUSHCHAK, Oleh. Neuroinflammation in pathogenesis of Alzheimer's disease: Phytochemicals as potential therapeutics. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 189, p. 111259, 2020.
- YANG, Shuang-shuang *et al.* The development prospection of HDAC inhibitors as a potential therapeutic direction in Alzheimer's disease. **Translational neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2017.