

**Estudos de *docking* molecular da interação de Bis-purinas com acetilcolinesterase para o tratamento da Doença de Alzheimer**

Molecular *docking* studies of Bis-purines interaction with acetylcholinesterase for the treatment of Alzheimer's disease

---

*Marcia Helena Rodrigues Velloso<sup>1</sup>, Christiane Mapheu Nogueira<sup>1</sup>, Débora Pereira Araújo<sup>1</sup>*

---

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Naturais, São Mateus, Espírito Santo, Brasil

Autor para correspondência: Marcia Helena Rodrigues Velloso

Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Naturais

Rodovia Governador Mário Covas Km 60, s/n, Litorâneo, CEP 29.932-540, São Mateus, Espírito Santo, Brasil

Tel: +55 27 3312-1659

*Email: marcia.velloso@ufes.br*

**Submetido em 28/07/2020**

**Aceito em 12/08/2020**

## RESUMO

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência no mundo. Embora a fisiopatologia da doença seja complexa, a redução das taxas de acetilcolina no hipocampo e córtex cerebral tem sido associada com essa patologia. Portanto, o uso de inibidores de acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), tem sido considerado como a melhor abordagem para o tratamento da doença. Inibidores com dupla interação com a enzima, ligando-se simultaneamente ao sítio catalítico aniônico (CAS) e ao sítio aniônico periférico (PAS), têm se destacado. No presente trabalho foi utilizado o *docking* molecular para avaliar a afinidade de diaminas de bis-purinas, com espaçadores metilênicos, pela enzima acetilcolinesterase. Os resultados obtidos indicaram que os compostos **5BP**, **7BP**, **10BP** e **11BP** possuem afinidade com a enzima através das interações observadas com os resíduos considerados importantes como Trp84 e Phe330 localizados no CAS. Além disso, todos os compostos mostraram interação com vários outros resíduos localizados no PAS e, embora não tenham apresentado interações com o Trp279, os compostos com maior afinidade, **5BP** e **11BP**, interagiram com o Asp72, sugerindo um papel decisivo nas suas afinidades.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer. Acetilcolinesterase. *Docking* Molecular. Bis-purinas.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most common form of dementia in the world. Although the disease's pathophysiology is complex, the reduction of rates of acetylcholine in the hippocampus and cerebral cortex has been associated with this pathology. Therefore, the use of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitors has been considered the best approach for disease's treatment. Inhibitors with double interaction with the enzyme, binding simultaneously to the anionic catalytic site (CAS) and to the peripheral anionic site (PAS), have been highlighted. In the present work, molecular docking was used to assess the affinity of bis-purine diamines, with methylene spacers, for the enzyme acetylcholinesterase. The results obtained indicated that the evaluated compounds **5BP**, **7BP**, **10BP** e **11BP** had affinity with the enzyme through interactions observed with residues considered important as Trp84 and Phe330 located in CAS. In addition, all compounds showed interaction with several other residues located in the PAS and, although they did not show interactions with Trp279, the most active compounds, **5BP** e **11BP**, interacted with Asp72, which suggests a decisive role in its affinities.

**Keywords:** Alzheimer's Disease. Acetylcholinesterase. Molecular docking. Bis-purines.

## INTRODUÇÃO

Estima-se que no mundo todo existam cerca de 50 milhões de pessoas sofrendo de algum tipo de demência. A demência pode ser definida como uma síndrome na qual há deterioração da memória, pensamento, comportamento e capacidade de realizar atividades diárias. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) 60-70% dos casos de demência são causados pela Doença de Alzheimer (DA) (WHO, 2020).

Na DA observa-se a perda progressiva da memória e outras funções cognitivas, afetando o funcionamento ocupacional e social. Além de alterações psíquicas e comportamentais, tais como psicose, alterações de humor e sono, agitação psicomotora e agressividade (FORLENZA, 2005).

A fisiopatologia da DA é complexa, envolvendo diferentes caminhos bioquímicos e, apesar de sua etiologia não ser completamente conhecida, diversos fatores como o acúmulo de placas neuríticas constituídas principalmente pela proteína  $\beta$ -amiloide (CASTRO & MARTINEZ, 2006), agregação de proteína  $\tau$  (ALONSO; GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, 1996), estresse oxidativo (ANDERSEN, 2004; DUMONT & BEAL, 2011) e o déficit colinérgico no hipocampo e córtex cerebral (CUMMINGS, 2004) têm sido associados à fisiopatologia da doença (IQBAL & GRUNDKE-IQBAL, 2000).

A hipótese colinérgica baseia-se na redução das taxas de acetilcolina (ACh) no hipocampo e córtex cerebral. Embora seja comum a diminuição progressiva dos níveis de acetilcolina durante o envelhecimento, nos pacientes com a DA os níveis desse neurotransmissor chegam a cair em até 90%, significando uma grande perda neuroquímica (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). Os inibidores das colinesterases são os principais fármacos atualmente licenciados para o tratamento da DA. Seu uso busca aumentar a disponibilidade sináptica de acetilcolina, através da inibição das suas principais enzimas catalíticas, a acetil (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE) (PINTO et al., 2015).

Dos cinco medicamentos utilizados atualmente para o tratamento da DA três são inibidores da acetilcolinesterase (AChE): o donepezil (Aricept®), a galantamina (Reminyl®) e a rivastigmina (Exelon®) (CHAVES & AVERSI FERREIRA, 2008). Mas, até o momento a DA não possui tratamento que possa curá-la, preveni-la ou interromper seu desenvolvimento. Todos os fármacos utilizados apresentam efeitos colaterais significativos e conferem apenas uma melhora temporária dos sintomas (FORLENZA, 2005; WHALEN; FINKEL; PANAVELIL, 2016).

A tacrina (Cognex®) foi o primeiro medicamento comercial aprovado para o tratamento da DA (TUMIATTI et al., 2010). Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição tanto da AChE como da BuChE. Porém, seu uso foi descontinuado pela excessiva hepatotoxicidade observada em 30% a 40% dos casos e pela a baixa biodisponibilidade (VALE et al., 2011). Mas, apesar dos problemas, vários estudos têm sido realizados com a sua estrutura como modelo no desenvolvimento de análogos bioativos com diferentes níveis de seletividade, almejando menor toxicidade e melhor perfil farmacocinético (MILELLI et al., 2017; PRZYBYŁOWSKA et al., 2019).

O sítio catalítico da AChE, composto pela tríade formada pelos resíduos Ser200, Glu327 e His440, está localizado na parte inferior de uma “garganta” profunda e estreita com cerca de 20Å de extensão. Além do sítio catalítico, a AChE possui mais 4 outros sítios localizados ao longo da “garganta”: sítio catalítico aniônico (CAS) (Trp84, Glu199 e Phe330), sítio de ligação do grupo acila (Phe288 e Phe290), sítio oxianiônico (Gly118, Gly119 e Ala201) e o sítio aniônico periférico (PAS) (Tyr 70, Asp 72, Tyr 121, Trp 279 e Tyr 334) localizado na entrada da “garganta” (KRYGER; SILMAN; SUSSMAN, 1999; JOHNSON & MOORE, 2006).

A estratégia de usar inibidores de AChE capazes de interagir duplamente com o sítio ativo da enzima foi testada primeiramente por Pang e colaboradores (1996). Os pesquisadores descobriram que o uso de espaçadores metilênicos unindo duas unidades de tacrina permitiam uma dupla interação do composto com o sítio ativo da enzima, ligando-se simultaneamente ao CAS e ao PAS. Dentre a série de bis-tacrinas com espaçadores metilênicos sintetizadas a mais ativa foi a bis(7)-tacrina que se mostrou 1.500 vezes mais potente que a tacrina na inibição da AChE. Após o estudo de Pang e colaboradores (1996), vários outros envolvendo o uso de inibidores de colinesterase, homo- ou hetero-diméricos, ligados por uma cadeia metilênica apareceram na literatura. Mais recentemente, uma série de híbridos tacrina-lofina foi estudada, sendo o composto com espaçador de 8 CH<sub>2</sub> o que apresentou melhor resultado na inibição da AChE, com o valor de IC<sub>50</sub> de 5,87 nM (DA COSTA et al., 2013). Estudos de uma série de híbridos tacrina-tianeptina mostraram que esses compostos atuam como inibidores potentes e seletivos frente a AChE e BuChE alcançando valores de IC<sub>50</sub> com concentração nanomolar (CESCHI et al., 2016). Lopes e colaboradores (2017) destacaram o estudo de bis-tacrinas quirais na inibição da AChE no qual o homodímero (R,R) e o heterodímero (R,S) apresentaram valores de IC<sub>50</sub> de 4,73 e 2,80 nM, respectivamente. Compostos contendo o núcleo da tacrina conectado à fração esquárica por uma cadeia de diaminoalquileno apresentaram alta atividade inibitória para a AChE com valores de IC<sub>50</sub> com concentrações nanomolares. Os estudos de

modelagem molecular mostraram que esses compostos atuam como inibidores de dupla interação, interagindo no sítio catalítico da enzima tanto com o CAS como com o PAS (CESCHI et al., 2020).

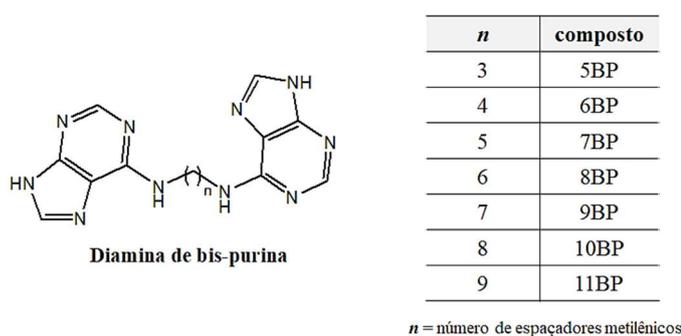
As purinas substituídas ou seus nucleosídeos/nucleotídeos desempenham papéis cruciais em várias funções nos organismos vivos (DINESH et al., 2012). Portanto, não é surpresa que compostos análogos às purinas tenham grande utilidade como agentes quimioterapêuticos (agentes antivirais, antibióticos e anticancerígenos) e em processos farmacodinâmicos (regulação do consumo de oxigênio no miocárdio e fluxo sanguíneo cardíaco) (BUTCHER et al., 2013; ISHIKAWA; AW; KANEKO, 2013; SOARES-BEZERRA et al., 2013). Muitos fármacos que estão estruturalmente relacionados com as purinas ou seus derivados afetam seletivamente processos biológicos através da interação com enzimas ou receptores no lugar de ligantes naturais com os quais se assemelham. Alguns estudos relatam o potencial de inibição de purina frente a AChE, como a zeatina, isolada de *Fiatoua villosa*, que apresentou  $IC_{50}$  de 109  $\mu$ M (VIEGAS Jr. et al., 2004). Derivados da *N*-benzilpiperidina-purina apresentaram inibição moderada com a AChE ( $IC_{50}$  = 20-50  $\mu$ M) mas a introdução de um espaçador metoximetilênico aumentou consideravelmente a inibição enzimática ( $IC_{50}$  = 0,1-1,0 $\mu$ M) (RODRÍGUEZ-FRANCO et al., 2005). Podemos destacar que o anel purínico pode interagir com resíduos aromáticos dos aminoácidos através das interações do tipo empilhamento  $\pi$  e com isso levar a obtenção de potenciais inibidores de colinesterases.

O desenvolvimento de novos fármacos a partir de estruturas químicas de fármacos já conhecidos (*ligand-based drug discovery*) baseia-se na comparação das estruturas dos compostos em estudo com estruturas químicas, ou perfis gerados a partir da estrutura química, de ligantes ativos testados *in vivo* ou *in vitro* (KOUTSOUKAS et al., 2011). Os resultados de atividade inibitória da AChE obtida pela bis(7)-tacrina a tornam uma molécula interessante para a pesquisa de outras moléculas inibidoras de AChE com o mesmo perfil farmacofórico (RYDBERG et al., 2006; LOPES et al., 2017; MILELLI et al., 2017).

Quando a estrutura 3D do alvo (enzima, DNA ou receptor) é conhecida, o candidato a fármaco pode ter sua atividade estimada através de estudos computacionais, economizando tempo e dinheiro. Na técnica de *docking* molecular estimasse a afinidade de um candidato à fármaco com a molécula alvo através do cálculo das possíveis conformações do complexo receptor-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 através da aplicação de funções de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de Van

der Waals, de ligações de hidrogênio, hidrofóbicos, os quais geram modelos matemáticos que predizem as melhores orientações do ligante, segundo uma lista de escores de energia (ELKAMHAWY et al., 2014).

Tendo em vista que a terapêutica atual da DA é apenas sintomática e que os inibidores de colinesterases são os principais fármacos licenciados para o tratamento da doença, é muito importante o desenvolvimento de novos agentes que interajam com a AChE como possíveis drogas para o tratamento da DA. Portanto, nesse trabalho foi utilizada a técnica computacional de *docking* molecular para avaliar a afinidade de diaminas de bis-purinas, com espaçadores metilênicos na posição 6 do anel purínico (Figura 1) com a AChE.



**Figura 1.** Estruturas das diaminas de bis-purinas usadas no *docking* molecular.

## METODOLOGIA

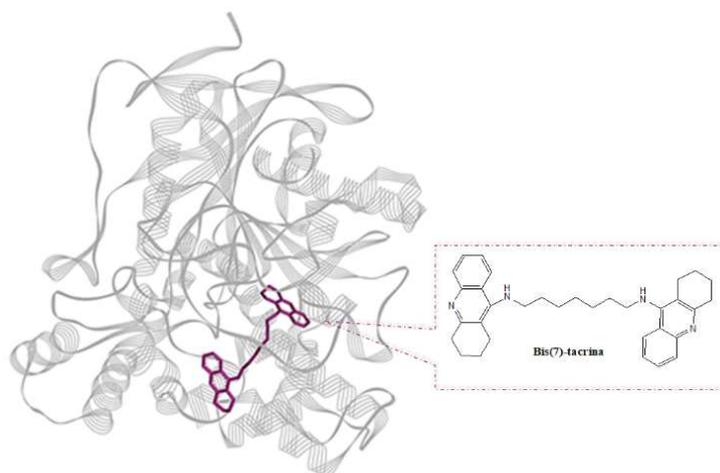
### *Construção, otimização e análise conformacional das diaminas de bis-purinas*

As estruturas tridimensionais das diaminas de bis-purinas utilizadas nesse estudo foram construídas e otimizadas utilizando o programa *Spartan*'18. Após otimização as estruturas foram submetidas à análise conformacional utilizando o campo de força MMFF. Para determinação das cargas atômicas parciais a estrutura do conformêro mais estável, obtido para cada composto, foi otimizada utilizando o método semiempírico RM1 (ROCHA et al., 2006).

### *Docking Molecular*

Para a seleção da estrutura tridimensional da enzima utilizada nos experimentos de *docking* foi realizada, inicialmente, uma busca no Banco de Dados de Proteínas (PDB) por enzimas complexadas com o ligante bis-tacrina. A utilização desse critério ocorreu pelo fato da bis-tacrina possuir estrutura próxima a dos compostos estudados, além de ser capaz de interagir simultaneamente com o CAS e o PAS. Foram encontradas 3 enzimas que atendiam a esse

critério, todas acetilcolinesterase de *Torpedo californica* (*TcAChE*). Considerando que a AChE costuma ter grande conservação estrutural e funcional entre as diferentes espécies e que as sequencias de aminoácidos das espécies *Homo sapiens* (*HuAChE*) e *Torpedo californica* (*TcAChE*) apresentam 57% de identidade e 86% de homologia (WIESNER et al., 2007; LUSHINGTON; GUO; HURLEY, 2010), assim como o fato de que os resíduos de aminoácidos que fazem parte de seus sítios ativos são os mesmos, havendo apenas uma mudança na numeração destes e uma mutação do tipo conservativa que não causa nenhuma diferença significativa às propriedades eletrostáticas e estéricas da cavidade do sítio ativo (ALMEIDA, 2015), pode-se dizer que a maioria das afirmações derivadas de um dos modelos estruturais mantem-se razoavelmente bem para o outro, não comprometendo os resultados obtidos (WIESNER et al., 2007; LUSHINGTON; GUO; HURLEY, 2010). Portanto, a enzima escolhida foi a acetilcolinesterase de *Torpedo californica* (*TcAChE*) complexada com o ligante (bis)7-tacrina com código PDB: 2CKM (RYDBERG et al., 2006) (Figura 2). Essa enzima foi utilizada anteriormente em estudos de *docking* de ligantes semelhantes à bis-tacrina (DE AQUINO et al., 2013; LOPES et al., 2017; MEENA et al., 2019).



**Figura 2.** Estrutura do complexo da bis(7)-tacrina (em magenta) com a *TcAChE* (código PDB: 2CKM).

Os experimentos de *docking* molecular e *redocking* foram realizados utilizando os programas gratuitos *AutoDock Tools* (ADT), versão 1.5.7 (MORRIS et al., 2009) e *AutoDock Vina* (TROTT & OLSON, 2010). Os ligantes foram considerados flexíveis enquanto a enzima foi considerada rígida. Além disso, para uma melhor caracterização das interações entre os

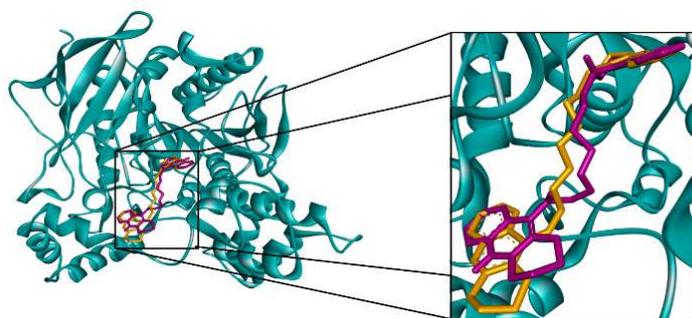
ligantes e a *TcAChE* no complexo enzimático, todos os experimentos foram realizados considerando os estados de protonação das espécies em pH fisiológico.

Para a visualização e análise dos resultados da melhor posição de encaixe (*pose*) dos ligantes foram utilizados os programas ADT e *Discovery Studio Visualizer*, versão 17.2.0. O *Discovery Studio Visualizer* também foi utilizado para geração das imagens.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento de *docking* molecular a busca da melhor *pose* entre o ligante e a biomolécula é efetuada dentro de um espaço tridimensional definido (*grid*), onde o programa realiza os cálculos de superfície potencial necessários à predição das interações entre o receptor e o ligante. Portanto, a parametrização correta do *grid* é muito importante para a obtenção de resultados com maiores níveis de confiabilidade. Assim, antes do *docking* dos ligantes foi realizado o procedimento de *redocking*. O *redocking* consiste em fazer o experimento de *docking* entre o receptor e o ligante cocristalizado e comparar a *pose* obtida com àquela do complexo original, validando o desempenho do programa de *docking* para o sistema em estudo. Quanto menor o desvio médio quadrático (RMSD) mais similares serão as estruturas e melhor será o modelo. Para que a parametrização seja considerada satisfatória o valor do RMSD obtido deve ser menor ou igual a 2Å (WANG; LU; WANG, 2003).

No experimento de *redocking* da bis(7)-tacrina com a *TcAChE* (código PDB: 2CKM) o valor de RMSD obtido foi igual a 1,38Å, validando parametrização para uso nos experimentos de *docking* com os ligantes derivados de diaminas de bis-purina (Figura 3).



**Figura 3.** *Redocking* do ligante bis(7)-tacrina na enzima *TcAChE*, código PDB: 2CKM. Em laranja a *pose* do ligante no cristal e em magenta a *pose* gerada no *docking*.

As simulações de *docking* molecular utilizando o programa *AutoDock Vina* forneceram 9 *poses* para cada um dos ligantes. A melhor *pose*, em cada caso, foi aquela com menor energia de afinidade. Com os valores das energias de afinidades receptor-ligante foram obtidas constantes de inibição enzimática,  $K_i$ , de acordo com a equação (SILVA JÚNIOR & GONÇALVES, 2019):

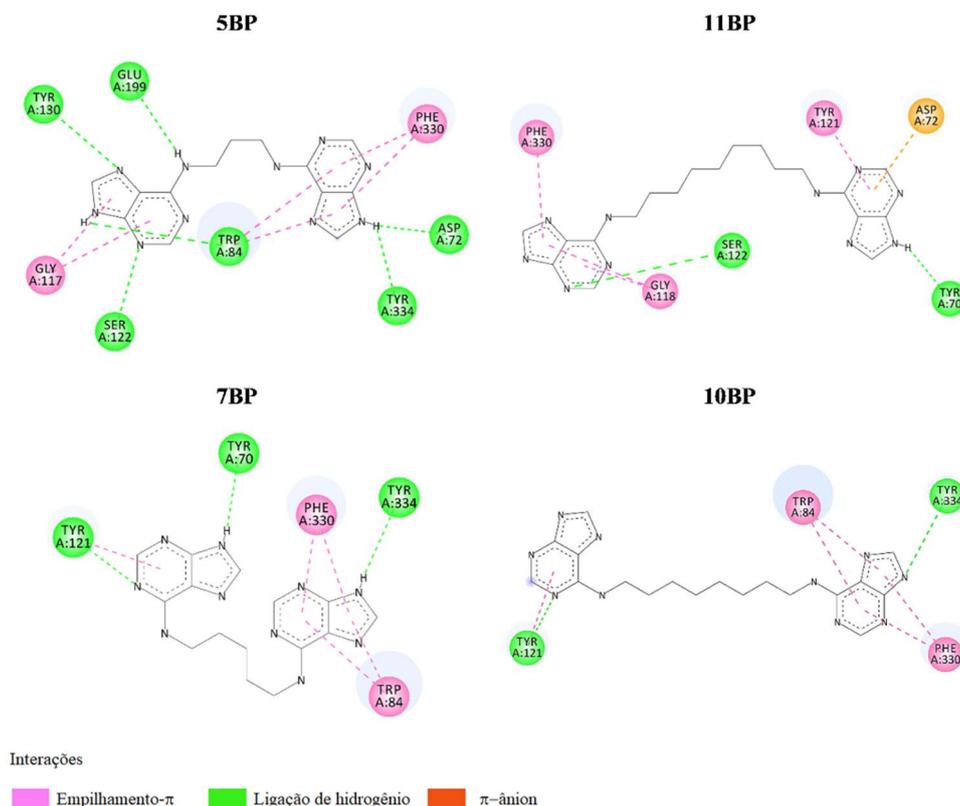
$$K_i = \exp(\Delta G/RT)$$

A constante de inibição, assim como a energia de afinidade, prediz informações sobre a estabilidade do complexo receptor-ligante formado. Quanto menor  $K_i$ , maior a estabilidade do complexo e conseqüentemente, maior a eficácia do ligante em inibir o receptor e menor a concentração do fármaco necessária à inibição da atividade enzimática (SILVA JÚNIOR & GONÇALVES, 2019).

Os resultados das energias de afinidade obtidas no *docking* molecular dos compostos estudados com a *TcAChE* e dos cálculos da constante de inibição são mostrados na Tabela 1, onde pode ser observado que os dois compostos que apresentaram maior afinidade com a enzima *TcAChE* foram o **5BP** e o **11BP**, e os compostos com menor afinidade foram o **7BP** e o **10BP**. Portanto, esses 4 compostos foram os escolhidos para as análises das interações intermoleculares do complexo receptor-ligante no sítio ativo da *TcAChE*. As representações esquemáticas 2D dos sítios de interação de seus complexos com a *TcAChE* são mostradas na Figura 4.

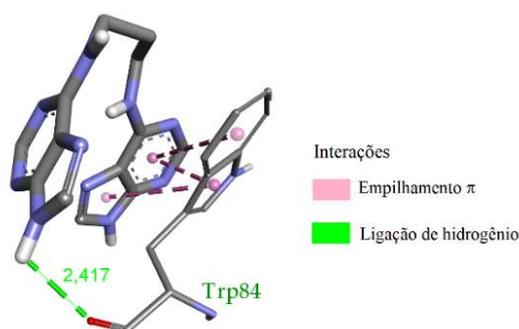
**Tabela 1.** Valores da energia de afinidade e das constantes de inibição calculadas.

Composto	Afinidade (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	Ki (μM)
<b>5BP</b>	-9,1	0,21
<b>6BP</b>	-8,9	0,30
<b>7BP</b>	-8,8	0,35
<b>8BP</b>	-8,9	0,30
<b>9BP</b>	-8,9	0,30
<b>10BP</b>	-8,8	0,35
<b>11BP</b>	-9,0	0,25



**Figura 4.** Representação 2D das interações intermoleculares dos compostos **5BP**, **11BP**, **7BP** e **10BP** com a enzima *TcAChE*.

Quase todos os compostos, com exceção do **11BP**, interagiram através de empilhamento  $\pi$  com o resíduo Trp84. Esse resíduo, localizado no CAS, próximo a “triade catalítica” (Ser200-His440-Glu327), tem sido utilizado em estudos de *docking* molecular como um marcador de inibição bem sucedida de AChE. Para o composto **5BP** observa-se também que, além da interação do tipo empilhamento  $\pi$ , há uma interação do tipo ligação de hidrogênio (Figura 5).



**Figura 5.** Interações do composto **5BP** com o resíduo Trp84.

Todos os compostos estudados mostraram interação do tipo empilhamento  $\pi$  com o Phe330. A interação com esse resíduo, assim como o Trp84, também foi observada para a tacrina e para bis(7)-tacrina. Em um estudo do desenvolvimento de um composto híbrido para o tratamento da DA, foi mostrada a importância desse aminoácido na estabilização da tacrina no sítio ativo, possibilitando a interação desta com o Trp84 (DA SILVA et al., 2006).

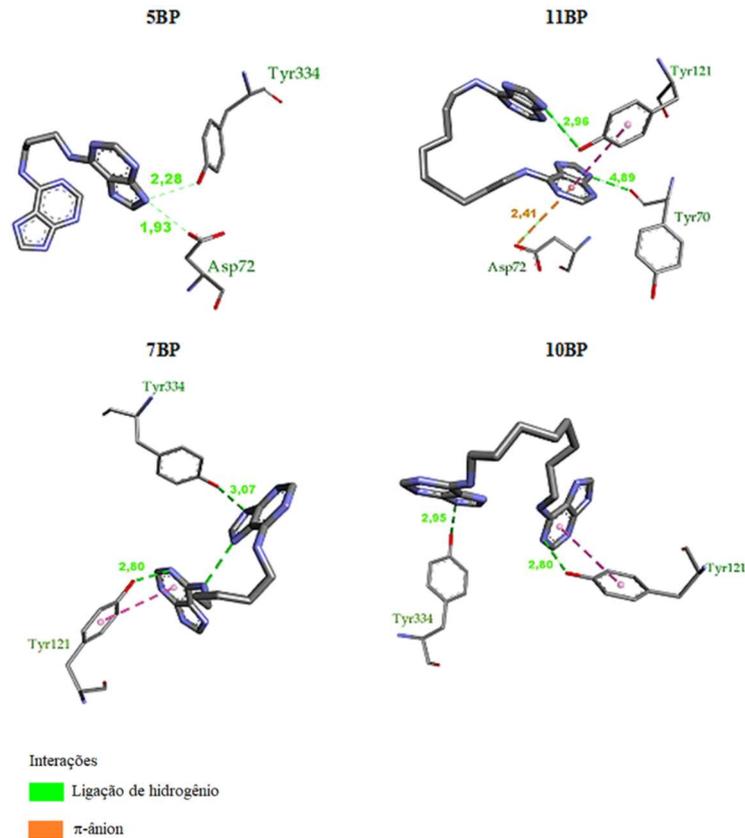
O composto **5BP** foi o único que apresentou interação com o resíduo Glu199, através de formação de ligação de hidrogênio (2,97Å). Esse resíduo localiza-se bem próximo a tríade catalítica e, juntamente com os resíduos Trp84 e Phe330, faz parte do CAS. Assim, o **5BP** foi o único composto que interagiu com todos os principais resíduos do CAS, sendo que com dois deles o fez através de formação de ligação de hidrogênio (Trp84 e Glu199).

Também foi observada interação dos compostos estudados com os aminoácidos localizados no PAS (Asp72, Tyr70, Tyr121, Tyr334) (Figura 6). Somente os ligantes com maior afinidade, **5BP** e **11BP**, apresentaram interação com o resíduo Asp72. No **5BP** a interação observada foi do tipo ligação de hidrogênio e no **11BP** do tipo  $\pi$ -ânion. O Asp72 é um resíduo negativamente carregado, o que faz com que suas interações apresentem um caráter mais eletrostático e, conseqüentemente, mais forte do que as interações hidrofóbicas e de Van der Waals. Esse comportamento pode ser observado através do valor, significativamente menor, do comprimento da ligação de hidrogênio da interação desse resíduo com o composto **5BP**, assim como na interação do tipo  $\pi$ -ânion, de natureza eletrostática, com o composto **11BP**. O **5BP** ainda apresenta interação do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr334 e o **11BP** interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos Try70 e Tyr121. Os compostos com as menores afinidades pela *TcAChE*, **7BP** e **10BP**, apresentaram interações do tipo ligação de hidrogênio somente com os resíduos Tyr121 e Tyr334.

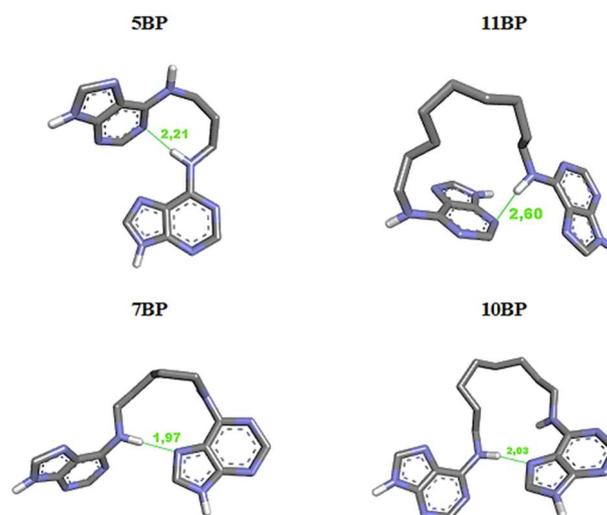
Embora todos os compostos analisados tenham apresentado dupla interação, com o CAS e com o PAS, com o sítio ativo da enzima *TcAChE*, através de ligações de hidrogênio, empilhamento- $\pi$  ou interação elétron- $\pi$ , o que é um comportamento desejável para um inibidor da enzima acetilcolinesterase, nenhum deles apresentou interação com o resíduo Trp279, considerado o mais importante do PAS (HAREL et al., 1993).

Em relação ao número de espaçadores não foi observada influência entre a quantidade desses e a afinidade receptor-ligante uma vez que os compostos com maiores afinidades foram o com menor (**5BP**) e o com maior (**11BP**) número de espaçadores metilênicos. Esse comportamento provavelmente está relacionado à formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio do grupo amino e o nitrogênio nas posições 1 (**5BP** e **11BP**)

e 7 (**7BP** e **10BP**) do anel purínico (Figura 7). A alta liberdade rotacional da cadeia metilênica permite a formação dessa ligação, o que mantém os dois anéis purínicos próximos, independentemente do número de espaçadores utilizado.

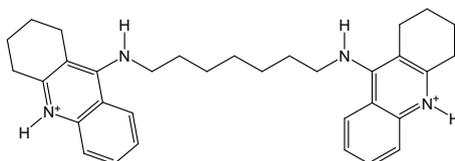


**Figura 6.** Resultados do *docking* molecular referentes às interações com o PAS, indicando as distâncias e aminoácidos.



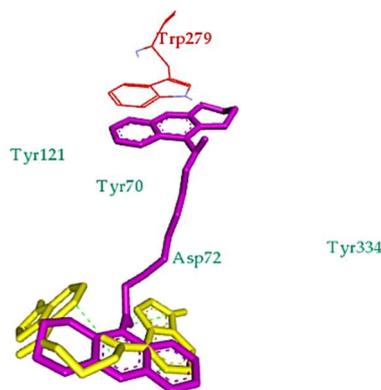
**Figura 7.** Ligação de hidrogênio intramolecular das diaminas de bis-purinas.

No caso da bis(7)-tacrina não há formação de ligação de hidrogênio intramolecular pois, ao contrário do que ocorre as diaminas de bis-purinas, no pH fisiológico ela se encontra na sua forma protonada (Figura 8) ou seja, o nitrogênio do anel quinolínico está na sua forma ácida, o que impossibilita a formação da ligação de hidrogênio.



**Figura 8.** Estrutura da bis(7)-tacrina em pH igual a 7,4.

A formação da ligação de hidrogênio intramolecular também explica por que os compostos não interagiram com o resíduo Trp279. Quando esses compostos entram no sítio ativo da enzima os dois anéis purínicos são mantidos próximos, em decorrência da ligação de hidrogênio intramolecular, em uma região do sítio ativo que fica mais afastada do Trp279. O que não ocorre com a bis(7)-tacrina, onde os e anéis ficam separados permitindo que um deles interaja com o Trp279 (Figura 9).



**Figura 9.** Visualização do composto **5BP** (em amarelo) e bis(7)-tacrina (magenta) no sitio ativo da *TcAChE*. Em destaque são mostrados os principais resíduos do PAS.

Por outro lado, a proximidade dos compostos estudados com o resíduo Asp72 permitiu a interação desse com os compostos **5BP** e **11BP**. Considerando que o **5BP** e o **11BP** foram os que apresentaram a maior afinidade, a interação com esse resíduo parece ser um fator importante na interação desses compostos com a enzima acetilcolinesterase.

Assim, todos os compostos analisados foram capazes de interagir duplamente com o sítio ativo da enzima *TcAChE*, mas os compostos que mostraram maior potencial de inibição foram o **5BP** e o **11BP**.

## AGRADECIMENTOS

À FAPES pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, JR. Planejamento, ensaio e otimização *in silico* de novos protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014, 156f.
2. ALONSO DCA, GRUNKE-IQBAL I, IQBAL K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2(7): 783-787, 1996.
3. ANDERSEN JK. Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? *Nat Rev Neurosci* 10(7): S18, 2004.
4. ARAÚJO CRM, SANTOS VLA, GONSALVES AA. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. *Rev Virtual Quim* 8(6): 1818-1834, 2016.
5. BUTCHER A, SCAMMELLS PJ, WHITE PJ, DEVINE, SM, ROSE'MEYER RB. An Allosteric Modulator of the Adenosine A1 Receptor Improves Cardiac Function Following Ischaemia in Murine Isolated Hearts. *Pharmaceuticals* 6(4): 546-556, 2013.
6. CASTRO A, MARTINEZ A. Targeting Beta-Amyloid Pathogenesis Through Acetylcholinesterase Inhibitors. *Curr Pharm Des* 12(33): 4377-4387, 2006.
7. CESCHI MA, COSTA JS, LOPES JPB, CÂMARA VS, CAMPO LF, BORGES ACA, GONÇALVES CAS, SOUZA DF, KONRATH EL, KARL ALM, GUEDES IA, DARDENNE LE. Novel series of tacrine-tianeptine hybrids: Synthesis, cholinesterase inhibitory activity, S100B secretion and a molecular modeling approach. *Eur J Med Chem* 121: 758-772, 2016.
8. CESCHI MA, PILOTTI RM, LOPES JPB, DAPONT H, ROCHA JBT, AFOLABI BA,

- GUEDES IA, DARDENNE LE. An Expedient Synthesis of Tacrine-Squaric Hybrids as Potent, Selective and Dual-Binding Cholinesterase Inhibitors. *J Braz Chem Soc* 31(5): 857-866, 2020.
9. CHAVES MDB, AVERSI FERREIRA TA. Terapia Medicamentosa da Doença de Alzheimer. *Rev Eletrônica Farm* 5(1): 1-7, 2008.
  10. CUMMINGS JL. Treatment of Alzheimer's disease: current and future therapeutic approaches. *Rev Neurol Dis* 1(2): 60-69, 2004.
  11. DA COSTA JS, LOPES JPB, RUSSOWSKY D, PETZHOLD CL, BORGES ACA, CESCHI MA, KONRATH E, BATASSINI C, LUNARDI PS, GONÇALVES CAS. Synthesis of tacrine-lophine hybrids via one-pot four component reaction and biological evaluation as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem* 62: 556-563, 2013.
  12. DA SILVA CHTP, CAMPO VL, CARVALHO I, TAFT CA. Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the design of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Graph Model* 25(2): 169-175, 2006.
  13. DE AQUINO RAN, MODOLO LV, ALVES RB, DE FÁTIMA A. Synthesis, kinetic studies and molecular modeling of novel tacrine dimers as cholinesterase inhibitors. *Org Biomol Chem* 11(48): 8395-8409, 2013.
  14. DINESH S, SHIKHA G, BHAVANA G, NIDHI S, DILEEP S. Biological activities of purine analogs: A review. *J Pharm and Sci Innov* 1(2): 29-34, 2012.
  15. DUMONT M, BEAL MF. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 51(5): 1014-026, 2011.
  16. ELKAMHAWY A, LEE J, PARK B, PARK I, PAE AN, ROH EJ. Novel quinazoline-urea analogues as modulators for A $\beta$ -induced mitochondrial dysfunction: design, synthesis, and molecular docking study. *Eur J Med Chem* 84: 466-475, 2014.
  17. FORLENZA OV. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Arch Clin Psychiatry* 32(3): 137-148, 2005.
  18. HAREL M, SCHALK I, EHRET-SABATIER L, BOUET F, GOELDNER M, HIRTH C, AXELSEN PH, SILMAN I, SUSSMAN JL. Quaternary ligand binding to aromatic

- residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci* 90(19): 9031-9035, 1993.
19. IQBAL K, GRUNDKE-IQBAL I. Alzheimer disease is multifactorial and heterogeneous. *Neurobiol Aging* 21(6): 901-904, 2000.
  20. ISHIKAWA T, AW W, KANEKO K. Metabolic Interactions of Purine Derivatives with Human ABC Transporter ABCG2: Genetic Testing to Assess Gout Risk. *Pharmaceuticals* 6(11): 1347-1360, 2013.
  21. JOHNSON G, MOORE SW. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr Pharm Des* 12(2): 217-225, 2006.
  22. KOUTSOUKAS A, SIMMS B, KIRCHMAIR J, BOND P, WHITMORE AV, ZIMMER S, YOUNG MP, JENKINS JL, GLICK M, GLEN RC, BENDER A. From in silico target prediction to multi-target drug design: Current databases, methods and applications. *J Proteom* 74(12): 2554-2574, 2011.
  23. KRYGER G, SILMAN I, SUSSMAN JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* 7(3): 297-307, 1999.
  24. LOPES JPB, DA COSTA JS, CESCHI MA, GONÇALVES CAS, KONRATH EL, KARL ALM, GUEDES IA, DARDENNE LE. Chiral Bistacrine Analogues: Synthesis, Cholinesterase Inhibitory Activity and a Molecular Modeling Approach. *J Braz Chem Soc* 28(11): 2218-2228, 2017.
  25. LUSHINGTON GH, GUO J, HURLEY MM. *Acetylcholinesterase Reprised: Molecular Modeling with the Whole Toolkit*. In: ATTA-UR-RAHMAN, REITZ AB, CHOUDHARY MI, KORDIK CP. *Frontiers in Medicinal Chemistry*, vol.5, Amsterdam: Bentham Science Publishers, 2010, p.423-456.
  26. MEENA VK, CHATURVEDI S, SHARMA R, MISHRA AK, HAZARI PP. Potent Acetylcholinesterase Selective and Reversible Homodimeric Agent Based on Tacrine for Theranostics. *Mol Pharm* 16(6): 2296-2308, 2019.
  27. MILELLI A, DE SIMONE A, TICCHI N, CHEN HH, BETARI N, ANDRISANO V,

- TUMIATTI V. Tacrine-based Multifunctional Agents in Alzheimer's Disease: An Old Story in Continuous Development. *Curr Med Chem* 24(32): 3522-3546, 2017.
28. MORRIS GM, HUEY R, LINDSTROM W, SANNER M, BELEW RK, GOODSSELL DS, OLSON AJ. AutoDock 4 and AutoDockTools 4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comp Chem* 30(16): 2785-2791, 2009.
29. PANG YP, QUIRAM P, JELACIC T, HONG F, BRIMIJOIN S. Highly Potent, Selective, and Low Cost Bis-tetrahydroaminacrine Inhibitors of Acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 271(39): 23646-23649, 1996.
30. PINTO RS, RODRIGUES-NETO EM, BARROS KBNT, VASCONCELOS LMO, GIRÃO-JUNIOR FJ, LOBO PLD, FONTELES MMF. Doença de Alzheimer: Abordagem farmacoterapêutica. *Bol Inf Geum* 6(1): 16-25, 2015.
31. PRZYBYŁOWSKA M, KOWALSKI S, DZIERZBICKA K, INKIELEWICZ-STEPNIAK I. Therapeutic Potential of Multifunctional Tacrine Analogues. *Curr Neuropharmacol* 17(5): 472-490, 2019.
32. ROCHA GB, FREIRE RO, SIMAS AM, STEWART JJP. RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *J Comput Chem* 27(10): 1101-1111, 2006.
33. RODRÍGUEZ-FRANCO MI, FERNÁNDEZ-BACHILLER MI, PÉREZ C, CASTRO A, MARTÍNEZ A. Design and synthesis of N-benzylpiperidine-purine derivatives as new dual inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Bioorg Med Chem* 13(24): 6795-6802, 2005.
34. RYDBERG EH, BRUMSHTEIN B, GREENBLATT H, WONG DM, SHAYA D, WILLIAMS LD, CARLIER PR, PANG YP, SILMAN I, SUSSMAN JL. Complexes of Alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J Med Chem* 49(18): 5491-5500, 2006.
35. SILVA JÚNIOR EGSS, GONCALVES AD SG. Estudo por docagem molecular de inibidores da enzima gsk-3 $\beta$ : uma proposta para o tratamento do transtorno bipolar. *Revista Ifes Ciência* 5(1): 243-256, 2019.
36. SOARES-BEZERRA RJ, CALHEIROS AS, SILVA FERREIRA NC, FRUTUOSO VS,

- ALVES LA. Natural Products as a Source for New Anti-Inflammatory and Analgesic Compounds through the Inhibition of Purinergic P2X Receptors. *Pharmaceuticals* 6(5): 650-658, 2013.
37. TROTT O, OLSON AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comp Chem* 31(2): 455-461, 2010.
38. TUMIATTI V, MINARINI A, BOLOGNESI ML, MILELLI A, ROSINI M, MELCHIORRE C. Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 17(17): 1825-1838, 2010.
39. VIEGAS JUNIOR C, BOLZANI VS, FURLAN M, FRAGA CAM, BARREIRO EJ. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento de Alzheimer. *Quim Nova* 27(4): 655-660, 2004.
40. VALE FAC, NETO YC, BERTOLUCCI PHF, MACHADO JCB, SILVA DJ, ALLAM N, BALTHAZAR MLF. Tratamento da Doença de Alzheimer. *Dement Neuropsychol* 5(1): 34-48, 2011.
41. WANG R, LU Y, WANG S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *J Med Chem* 46(12): 2287-2303, 2003.
42. WHALEN K, FINKEL R, PANAVELIL TA. *Farmacologia Ilustrada*, 6.ed, Porto Alegre: Artmed, 2016, 680p.
43. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dementia. Geneva: WHO, 2019. Available from: <httphttps://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> Accessed on July 10, 2020.
44. WIESNER J, KŘÍŽ Z, KUČA K, JUN D, KOČA J. Acetylcholinesterases - the structural similarities and diferences. *J Enzyme Inhib Med Chem* 22(4): 417-424, 2007.