

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Estudo semiempirico da inibição da enzima AChE por policetídeos
extraídos da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus***

SUZANA VIEIRA DA SILVA

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**Estudo semipempirico da inibição da enzima AChE por policetídeos
extraídos da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus***

SUZANA VIEIRA DA SILVA

Sob a orientação da Professora
Dra. Clarissa Oliveira da Silva

e Co-orientação do Professor
Dr. Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna

Dissertação submetida como
requisito parcial para a obtenção
do grau de **Mestre em Ciências**,
no curso de Pós-Graduação em
Química.

Seropédica, R.J.
Maio de 2009

599.935

S586e

T

Silva, Suzana Vieira da, 1974-.

Estudo semiempírico da enibição da enzima AChE por policetídeos extraídos da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus* / Suzana Vieira da Silva - 2009.

68 f.

Orientador: Clarissa Oliveira da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 51-56.

1. Genética humana - Teses. 2. Colinesterases - Inibidores - Teses. 3. Policetídeos - Teses. I. Silva, Clarissa Oliveira da, 1970-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

SUZANA VIEIRA DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências,
no Curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Físico-Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

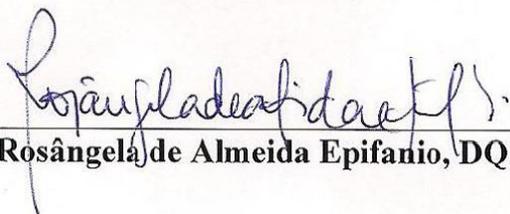
12 de junho de 2009



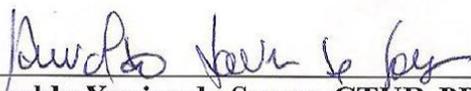
Clarissa Oliveira da Silva, Dequim-ICE, UFRRJ



Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna, Dequim-ICE, UFRRJ



Rosângela de Almeida Epifanio, DQO-IQ, UFF



Anivaldo Xavier de Souza, CTUR-PPGQ, UFRRJ

Suplente: André Gustavo Horta Barbosa, D. Sc., IQ-UFF

Ao meu companheiro Mário Ricardo, minha filha Maria Isabel, minha mãe *in memoriam* e a minha irmã Claudia que sempre enxergam, no meio dos meus muitos defeitos, as minhas melhores qualidades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter permitido que eu chegasse até aqui.

À minha filha muito amada Maria Isabel por que se consegui chegar até aqui foi para dar este orgulho a ela.

À minha mãe Isabel Cristina (*in memorian*) que sempre acreditou em minha capacidade de superação mais do que eu mesma.

À minha irmã Claudia e meu cunhado Itéildo pelo apoio carinhoso e financeiro que me permitiram concluir a graduação para que eu pudesse chegar ao fim de mais essa etapa.

Ao meu companheiro Mário Ricardo que me acompanha desde o início deste mestrado com muito amor e compreensão.

À minha orientadora Clarissa Oliveira da Silva pela amizade e profissionalismo, e pelas conversas pessoais nos momentos mais difíceis quando muitas vezes eu pensei em desistir.

Ao meu co-orientador Carlos Maurício pelo seu profissionalismo e sua paciência com a minha inexperiência.

Agradeço a banca avaliadora

As amigas Tianna, Andréa, Natalie, Letícia e Cinthya que me davam força, carinho e palavras de apoio em todos os momentos.

Aos amigos do grupo, principalmente minha amiga Cinthia, não só pelo carinho e palavras amigas como pela paciência em me ajudar com as minhas inúmeras dificuldades.

Aos amigos do curso de Pós-graduação em Química pelas conversas descontraídas nos corredores, mas principalmente pela ajuda dos amigos André Vinicius, Cláudio, Anivaldo e Catarina.

À UFRRJ que me acolheu como a uma filha me permitindo adquirir conhecimento profissional e de vida que levarei como um tesouro pelo resto de minha vida.

Aos órgãos de fomento Capes, CNPq, e faperj que me deram condições financeiras para concluir meu curso com louvor.

RESUMO

Silva, Suzana Vieira da Silva. **Estudo semiempirico da inibição da AChE por policetídeos extraídos da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus***. 2009. p. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

O Mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que atinge às funções cognitivas entre elas a memória, atenção e aprendizagem. A principal estratégia utilizada para seu tratamento está direcionado na busca de melhorar a hipofunção colinérgica, inibindo a enzima acetilcolinesterase, para que a acetilcolina possa permanecer mais disponível na fenda sináptica para as realizações das sinapses, já que esta enzima tem a função de hidrolisar a acetilcolina. A natureza oferece uma enorme variedade de substâncias utilizadas como fármacos e as esponjas marinhas tem demonstrado serem ricas nestas substâncias. Foram extraídos da esponja *Plakortis angulospiculatus* três policetídeos que através do método Ellman demonstraram atividade anticolinesterásica. Através de técnicas de Modelagem Molecular, foram realizados cálculos semiempiricos utilizando o método PM3 para analisar as interações geométricas e energias envolvidas no complexo policetídeos-acetilcolinesterase com o objetivo de analisar uma possível utilização destes como fármacos para o Mal de Alzheimer. Como não se conhecia o estado em que o sítio se encontraria (com a Ser200 e His440 neutros ou não) no momento da interação, foram realizados cálculos para os três policetídeos em ambos os sítios. Estudos com inibidores já conhecidos tacrina e huprina X (ambas neutra e protonadas) também foram realizados em ambos os sítios a fim de comparação. O resultados obtidos neste trabalho mostraram a confiabilidade do método empregado, assim também como valores de entalpia favoráveis para a formação de todos os complexos policetídeo-acetilcolinesterase independente do sítio. Observou-se pelos valores energéticos uma preferência quando os mesmos se encontravam no sítio protonado diferencialmente dos inibidores tacrina e huprina X que independente do seu estado (protonados ou não) mostraram melhor interação pelo sítio neutro. Os cálculos realizados para a tacrina demonstraram que mesmo após otimização as principais interações já descritas pela literatura se mantiveram e que possivelmente ela se encontra protonada dentro do sítio visto os valores de energia encontrados para esta estrutura. A huprina X que é um híbrido da tacrina com a huperzina A mostrou as interações mais significativas assim também como os valores energéticos mais favoráveis, o que está de acordo com a alta constante de inibição de 26pM encontrados na literatura para a acetilcolinesterase de humano. Diante dos dados obtidos podemos concluir que os policetídeos apesar de obterem valores energéticos favoráveis a formação do complexo policetídeo-acetilcolinesterase estes valores não são competitivos com os valores energéticos encontrados para os inibidores tacrina e huprina X. No entanto, na fabricação de um fármaco não são levados em conta apenas interações energéticas e como a tacrina já demonstrou possuir alta toxicidade hepática, além de reações adversas como náusea e vômito, os policetídeos por serem substância naturais poderiam neste caso ser competitivos se demonstrassem possuir reações adversas mais brandas.

Palavras chaves: Acetilcolinesterase, policetídeos, Modelagem Molecular

ABSTRACT

The Evil of Alzheimer is a disease neurodegenerativa that reaches to the cognitive functions among them the memory, attention and learning. The main strategy used for his/her treatment is addressed in the search of improving the hipofunção colinérgica, inhibiting the enzyme acetylcholinesterase, so that the acetylcholine can stay more available in the rift sináptica for the accomplishments of the sinapses, since this enzyme has the hidrolisar function the acetylcholine. The nature offers an enormous variety of substances used as fármacos and the sea sponges has been demonstrating be rich in these substances. They were extracted of the sponge *Plakortis angulospiculatus* three polyketides that through the method Ellman demonstrated activity anticolinesterásica. Through techniques of Molecular Modelling, calculations semiempíricos were accomplished using the method PM3 to analyze the geometric interactions and energies involved in the compound polyketides-acetylcholinesterase with the objective of analyzing a possible use of these as fármacos for the Evil of Alzheimer. As if he/she didn't know the state in that the ranch would be (with Ser200 and neutral His440 or no) in the moment of the interaction, calculations were accomplished for the three polyketides in both ranches. Studies with inhibitors already known tacrina and huprina X (both neutral one and protonadas) they were also accomplished at both ranches in order to comparison. Resulted obtained he in this work showed the reliability of the employed method, likewise as values of favorable entalpia for the formation of all the compounds independent pollyketide-acetylcholinesterase of the ranch. It was observed by the energy values a preference when the same ones if they found in the ranch protonado diferencialmente of the inhibitors tacrina and huprina X that independent of his/her state (protonados or no) they showed better interaction for the neutral ranch. The calculations accomplished for the tacrina demonstrated that even after optimization the main interactions described already by the literature stayed and that possibly she meets protonada inside of the seen ranch the values of energy found for this structure. The huprina X that is a hybrid of the tacrina with the huperzina A it showed HER likewise the most significant interactions as the more favorable energy values, what is in agreement with the high constant of inhibition of 26pM found in the literature for human's acetilcolinesterase. Before the obtained data we can end that the polyketides in spite of they obtain favorable energy values the formation of the compound polyketide-acetylcholinesterase these values are not competitive with the energy values found for the inhibitors tacrina and huprina X. however, in the production of a fármaco they are not taken into account just energy interactions and as the tacrina it already demonstrated to possess high hepatic toxicity, besides adverse reactions as nausea and vomit, the polyketides for they be natural substance were able to in this case be competitive if they demonstrated to possess softer adverse reactions.

Key words: Acetylcholinesterase, polyketides, Molecular Modelling

TABELAS

Tabela 1 - Principais efeitos da superestimulação da acetilcolina nos seus receptores (SIDELL, 1994).	10
Tabela 2 – Porcentagem de efeitos adversos decorrentes do tratamento com placebo ou donepezil entre pacientes com Mal de Alzheimer (INOUYE & OLIVEIRA, 1998).	18
Tabela 3 – Valores de entalpia de formação das etapas 1, 2 e 3 (Figura 18) da hidrólise da ACh pela AChE calculados pelo método semiempírico.	33
Tabela 4 – Valores de entalpia ($\Delta H^{\circ}_{298} = \Delta H^{\circ}_{298}(\text{Po11} + \text{AChE}) - [\Delta H^{\circ}_{298}(\text{AChE}) + \Delta H^{\circ}_{298}(\text{Po11})]$), e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE à molécula de policetídeo 1 em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.	34
Tabela 5 - Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE à molécula de policetídeo 2 em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.	37
Tabela 6 - Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE à molécula de policetídeo 3 em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.	40
Tabela 7 - Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE (1ACJ do PDB) à tacrina neutra em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.	43
Tabela 8 – Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE (1ACJ do PDB) à tacrina protonada em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.	44
Tabela 9 – Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE (1ACJ do PDB) à huprina X neutra em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.	46
Tabela 10 – Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE (1ACJ do PDB) à huprina X protonada em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.	47

FIGURAS

Figura 1 - Acetilcolina.	05
Figura 2 – Esquema dos impulsos nervosos dos neurônios.	05
Figura 3 - Sítios de ação da acetilcolina no sistema nervoso e seus receptores (STINE, 1996).	06
Figura 4 – Síntese da acetilcolina pela enzima colina acetiltransferase (ChAT).	07
Figura 5 - Hidrólise da acetilcolina.	08
Figura 6 - Desenho esquemático representando a neurotransmissão colinérgica (modificado de PURVES et al, 2001).	08
Figura 7 – Formas moleculares da acetilcolinesterase (TAYLOR & RADIĆ, 1994)	11
Figura 8 – Estrutura tridimensional da acetilcolinesterase do <i>Torpedo californica</i> (SILMAN & SUSSMAN, 2005).	12
Figura 9 – Sítio catalítico da AChE (adaptado de SOREQ & SEIDAM, 2001).	13
Figura 10 – Mecanismo genérico de acilação e desacilação da ACh e outros substratos.	15
Figura 11 – Mecanismo de hidrólise da ACh pelos resíduos Ser200 e His440 da AChE	15
Figura 12 – Inibidores da enzima acetilcolinesterase.	20
Figura 13 – Policetídeos 1, 2 e 3.	22
Figura 14 – Enzima AChE de código 1 AMN com o inibidor <i>m</i> -(<i>N,N,N</i> -trimetilamônio)-2,2,2-trifluoroacetofenona (TMTFA).	27
Figura 15 – Estrutura otimizada do policetídeo 1 no sítio 2 da AChE.	29
Figura 16 – Estrutura otimizada do policetídeo 2 no sítio 2 da AChE	30
Figura 17 – Estrutura otimizada do policetídeo 3 no sítio 2 da AChE.	30
Figura 18 – Os três primeiros passos do mecanismo de hidrólise da Ach pelos resíduos Ser200 e His440 da AChE.	30

Figura 19 – Enzima AChE de código 1 ACJ com inibidor tacrina.	31
Figura 20 – Principais interações estabelecidas entre o policetídeo 1 no sítio 2.	32
Figura 21 – Representação da sobreposição dos complexos AChE-Policetídeo 1 nos sítio 1 e 2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sítio 1. A região de diferença entre os sítios da AChE que encontram-se protonados (sítio 2) ou não (sítio 1) são evidenciados no círculo vermelho.	34
Figura 22 – Representação da sobreposição do complexo AChE-Policetídeo 1 no sítio 1 sobre o sítio vazio neutro. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sítio vazio. A região de diferença entre os sítios da AChE que encontram-se protonados (sítio 2) ou não (sítio 1) são evidenciados no círculo vermelho.	35
Figura 23 – Principais interações estabelecidas entre o policetídeo 2 no sítio 2.	36
Figura 24 – Representação da sobreposição dos complexos AChE-Policetídeo 2 nos sítio 1 e 2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sítio 1. A região de diferença entre os sítios da AChE que encontram-se protonados (sítio 2) ou não (sítio 1) são evidenciados no círculo vermelho.	37
Figura 25 – Representação da sobreposição do complexo AChE-Policetídeo 2 no sítio 1 sobre o sítio vazio neutro. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sítio vazio.	38
Figura 26 – Principais interações estabelecidas entre o policetídeo 3 no sítio 2.	39
Figura 27 – Representação da sobreposição dos complexos AChE-Policetídeo 3 no sítio 1 e 2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sítio 1. A região de diferença entre os sítios da AChE que encontram-se protonados (sítio 2) ou não (sítio 1) são evidenciados no círculo vermelho.	39
Figura 28 – Representação da sobreposição do complexo AChE-Policetídeo 3 no sítio 1 sobre o sítio vazio neutro. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sítio vazio.	41
Figura 29 – Tacrina protonada no sítio ativo da AChE protonado (sítio 2).	42
Figura 30 – Huprina X protonada no sítio ativo da AChE protonado (sítio 2).	43

INTRODUÇÃO

O Mal de Alzheimer (MA) é uma doença neurodegenerativa que envolve deficiência orgânica cognitiva, principalmente perda de memória, capacidade de raciocínio e comunicação. Em estágios mais avançados o MA é caracterizado por depressão, problemas no comportamento, incluindo agitação, alterações de humor e psicose. Essa doença atinge principalmente pessoas acima de 65 anos causando além dos malefícios intrínsecos ao seu desenvolvimento, enormes prejuízos econômicos (ABREU, 2005).

O MA é causado por um déficit de diversos neurotransmissores sendo o principal a acetilcolina (ACh). Uma abordagem possível para o tratamento dessa doença seria a restauração da função colinérgica, afetada pela redução na produção da acetilcolina. A utilização de inibidores da enzima acetilcolinaesterase (AChE) é uma estratégia usada para o tratamento dessa doença.

A acetilcolina é a responsável pelas sinapses no sistema nervoso central e a AChE age sobre a ACh hidrolisando-a rapidamente através de um mecanismo de acilação e desacilação.

Os preços relativamente onerosos dos inibidores hoje comercializados: tacrina, donepezil, galantamina e rivastigmina, assim como sua grande hepatotoxicidade torna a busca por inibidores naturais objeto de pesquisa muito interessante.

Estudos de estruturas cristalográficas obtidas por técnicas de raios-x para elucidar as interações presentes na AChE complexada com vários inibidores têm fornecido informações estruturais importantes. Tais informações permitem identificar sítios onde acontece a interação entre resíduos de aminoácidos específicos da enzima e o substrato, e assim melhor compreender o mecanismo de ação da AChE com novos inibidores. Esse tipo de ferramenta é utilizada na química teórica através de cálculos de mecânica molecular (MM) ou mecânica quântica (MQ).

O entendimento do mecanismo de ação e de inibição da AChE pode ser utilizado como uma importante ferramenta na elaboração de novos inibidores e abre novas estratégias para modelar compostos com propriedades farmacológicas para o Mal de Alzheimer.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MAL DE ALZHEIMER

Segundo Vieira no Brasil aproximadamente R\$ 59 milhões de recursos são aplicados anualmente para retardar a evolução da doença do Mal de Alzheimer. Estes recursos parecem insuficientes quando comparados aos 82 bilhões de dólares gastos pelo governo americano para assistência aos 4,5 milhões de portadores da doença (VIEIRA, 2007).

O Mal de Alzheimer tem como principal fator de risco a idade, pois sua prevalência passa de 10-15% em pessoas entre 60-65 anos, para 20% em pessoas acima dos 80 anos e cerca de 40% em idosos acima dos 90 anos (GANDIA, 2002). Por estes elevados índices, o Mal de Alzheimer tem sido caracterizado como um problema de saúde pública, atingindo grande parte das funções cognitivas incluindo memória, atenção e aprendizado, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e julgamento (COSTA *et al.*, 2002).

O Mal de Alzheimer atinge mais de 20 milhões de pessoas e é a quarta causa de mortalidade em idosos acima de 65 anos em países desenvolvidos, perdendo apenas para o câncer, as doenças cardiovasculares e complicações pulmonares; por isso também é responsável por um enorme custo financeiro para governo e sociedade (ABREU *et al.*, 2005; CACABELOS, 2001; GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; INOUE & OLIVEIRA, 2004).

Essa doença é caracterizada por uma neurodegeneração progressiva e lenta, além de implicar em diversas interações histopatológicas como: atrofia do córtex cerebral, com perda dos neurônios corticais e subcorticais, formação de placas senis (enovelados neurofibrilares), alterações do metabolismo amilóide e nos neurotransmissores bem como perdas sinápticas e a morte neural (COSTA *et al.*, 2002; FORLENZA, 2005; GANDIA, 2002).

O desenvolvimento do Mal de Alzheimer afeta não somente a função cognitiva como também a vida familiar e social desses doentes e de seus familiares; já que tal desenvolvimento interfere nas suas atividades da vida diária (AVD) e, portanto, na sua autonomia tornando-o dependente de um cuidador (ABREU *et al.*, 2005; INOUE & OLIVEIRA, 2004; VIEIRA, 2007).

A maioria dos idosos com Mal de Alzheimer passa por três fases da doença, sendo a fase inicial caracterizada por: formas leves de esquecimento, dificuldade em pensar com clareza, dificuldade em memorizar, perda discreta de autonomia para as AVD, descuido da aparência pessoal, desorientação no tempo e no espaço, perda de espontaneidade e julgamento

e dificuldade para registrar novas informações (ABREU *et al.*, 2005; INOUE & OLIVEIRA, 2004).

Numa fase intermediária encontra-se dificuldade em reconhecer as pessoas, dificuldade em realizar as tarefas mais simples, como utilizar utensílios domésticos, vestir-se ou cuidar da própria higiene e alimentar-se, incapacidade de aprendizado, detém algumas lembranças do passado remoto, perambulação, incontinência, comportamento inadequado, irritabilidade, hostilidade, agressividade e incapacidade de julgamento e pensamento obcecado (ABREU *et al.*, 2005; INOUE & OLIVEIRA, 2004).

Na fase terminal os doentes apresentam perda de peso mesmo com dieta adequada, total dependência de um cuidador, restrição ao leito, incapacidade das AVD, irritabilidade extrema, funções cerebrais deterioradas e morte (ABREU *et al.*, 2005; INOUE & OLIVEIRA, 2004).

Apesar da natureza multifatorial do MA a origem da sua patogênese é claramente conhecida e as estratégias utilizadas para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento dessa doença tem sido dirigida basicamente para o peptídeo β -amilóide e a transmissão colinérgica (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; ROBERSON & MUCKE, 2006).

A neurohistopatologia do MA é caracterizada pela aparição de placas senis extracelulares que são o principal componente das placas do peptídeo β -amilóide, e os enovelados neurofibrilares devido à hiperfosforilação da proteína “tau” (MARCO, 2002).

Segundo Chaves *et al.*, a proteína “tau” normalmente exerce um papel vital no sistema de “turnover” de microtúbulos intracelulares que carregam moléculas e organelas na célula. Esta proteína é codificada por um gene localizado no cromossomo 17, e por razões ainda desconhecidas, sofre o processo de hiperfosforilação no MA. A proteína “tau” hiperfosforilada deixa de se ligar aos microtúbulos e forma filamentos helicoidais pareados insolúveis que se agregam formando os emaranhados neurofibrilares. A densidade dos fusos neurofibrilares correlaciona-se com a gravidade da doença (CHAVES & AVERSI-FERREIRA, 2008).

Uma superprodução do peptídeo β -amilóide, sua agregação e sua subsequente deposição como placas amilóides insolúveis pode representar o início do desenvolvimento da doença (MARCO, 2002).

Porém estudos a respeito de inibidores tipo β e γ -secretases ou inibidores que impeçam a agregação das placas amilóides estão em desenvolvimento inicial e constituem uma importante estratégia utilizada para o desenvolvimento de fármacos no combate a essa doença (GLABE, 2006).

Alterações genéticas, neurológicas e neurofisiológicas como também a redução das funções colinérgica central também são características do Mal de Alzheimer. Nas disfunções acometidas pela doença estão também redução da acetilcolina (ACh), redução da atividade da enzima colina acetiltransferase (ChAT), alteração no número e sensibilidade dos receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais e sensibilidade aumentada aos efeitos de drogas anticolinérgicas (FORLENZA, 2005; INOUE & OLIVEIRA, 2004).

Existem também outras como, por exemplo, a utilização ou substituição de precursores de acetilcolina, como colina ou lecitina, mas esses não respondem eficientemente ao incremento da atividade colinérgica central. Uma outra abordagem dada ao problema, envolve a utilização de agonistas específicos de receptores muscarínicos (M_1) e nicotínicos ou antagonistas muscarínicos (M_2). Outros estudos visam o uso de inibidores reversíveis de acetilcolinaesterase (AChE) que reduzem a hidrólise de acetilcolina, há também uma abordagem terapêutica em que são desenvolvidos agonistas diretos de receptores muscarínicos pós-sinápticos M_1 , em que o estímulo destes receptores ocasionou o aumento da cognição em animais (VIEIRA, 2007).

No entanto, a estratégia atual que tem sido amplamente utilizada para o tratamento desta doença baseia-se na correção das disfunções colinérgicas pelo fato de melhorar a hipofunção colinérgica, deixando a acetilcolina mais disponível para a realização das sinapses, pois aumenta a sua concentração na fenda sináptica. É por esse caminho que se tem encontrado os melhores resultados nos testes clínicos, recuperando parcialmente os pacientes da perda de memória e do deficit colinérgico (BELEDO, 1998; FORLENZA, 2005).

2.2 - SISTEMA COLINÉRGICO

A acetilcolina (**Figura 1**) é um dos mais importantes neurotransmissores do sistema nervoso central e periférico.

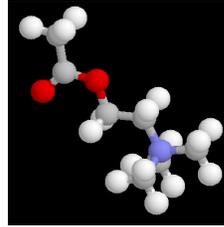
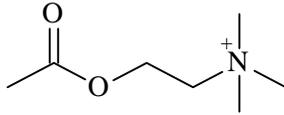


Figura 1: Acetilcolina

O principal papel da acetilcolina está na neurotransmissão dos impulsos nervosos no sistema nervoso central e periférico, como também na sinalização dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo (SNA), tanto nos ramos simpáticos como parassimpáticos (**Figura 2**) (BIRKS *et al.*, 1961)

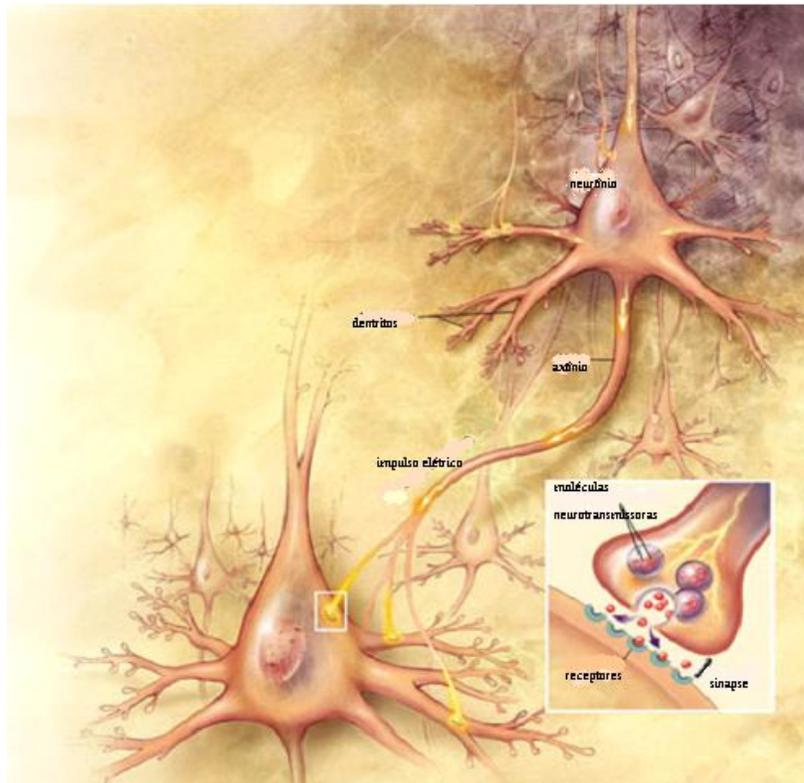
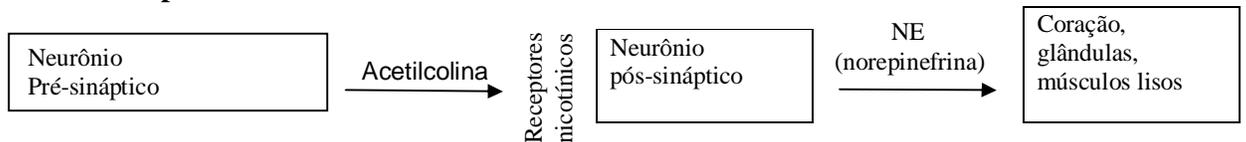


Figura 2: Esquema dos impulsos nervosos dos neurônios. Disponível em: <http://papodehomem.com.br/we-are-all-on-drugs/>, acesso em: 09/04/2009. Adaptada por Silva, 2009.

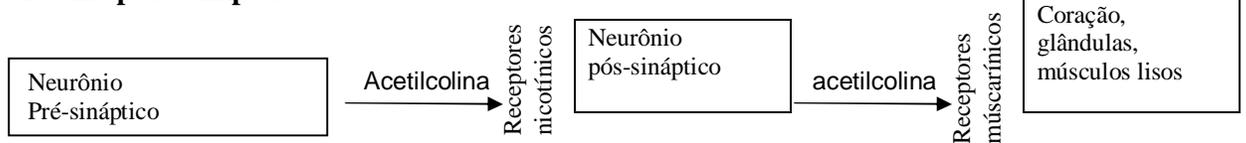
A ACh é responsável também pelas sinapses pós-ganglionares do sistema nervoso parassimpático controlando órgãos efetores como coração, pulmão, glândulas exócrinas e endócrinas, intestino e bexiga (HOFFMAN & TAYLOR, 2001). Ela é o neurotransmissor da junção neuromuscular (JNM) sendo sintetizada por todos os neurônios motores na medula espinhal e no tronco encefálico, exercendo o controle da contração muscular além de funções motoras, funções neuroendócrinas, funções parassimpáticas e funções sensoriais (**Figura 3**) (MISGELD *et al.*, 2002).

A neurotransmissão colinérgica tem um importante papel modulatório, especialmente sobre funções cognitivas. Manipulações farmacológicas que interferem com a atividade colinérgica podem alterar o resultado de tarefas como aprendizagem, atenção e memória (GOLD, 2003)

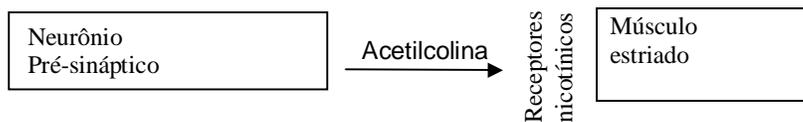
Sistema simpático



Sistema parassimpático



Junção neuromuscular



Sistema nervoso central

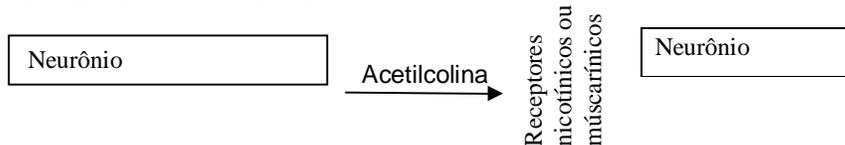


Figura 3: Sítios de ação da acetilcolina no sistema nervoso e seus receptores (Adaptado de STINE, 1996).

Os neurônios colinérgicos do sistema nervoso central apresentam uma distribuição bastante difusa. Interneurônios colinérgicos estão presentes no corpo estriado. Além destes

neurônios, existem dois sistemas colinérgicos modulatórios importantes, de projeção difusa no encéfalo: o complexo prosencefálico basal e o pontemencefalotegmental. O primeiro complexo é assim denominado em função da dispersão que os neurônios colinérgicos assumem entre diversos núcleos relacionados entre si e localizados no centro do telencéfalo, medial e ventralmente aos núcleos da base. Destacam-se os núcleos do septo medial, responsáveis pela inervação colinérgica do neocórtex. O complexo pontemesencefalotegmental inclui as células da ponte e do tegmento mesencefálico que utilizam ACh, responsáveis pela regulamentação da excitabilidade de núcleos retransmissores sensoriais, principalmente no tálamo dorsal, juntamente com os sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos (BEAR *et al.*, 2002)

A ACh é um éster acético de colina e é sintetizada no citosol pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), que é específica das terminações nervosas colinérgicas, a partir dos substratos colina e acetil coenzima A (**Figura 4**). (OLIVEIRA, 2007; JOSÉ, 2007).

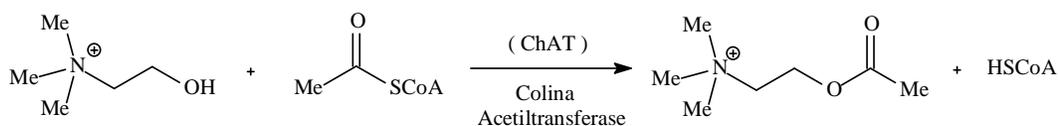


Figura 4: Síntese da acetilcolina pela enzima colina acetiltransferase (ChAT)

Após a síntese a molécula de ACh é armazenada em vesículas sinápticas por um transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Estima-se que cada vesícula contém de 5.000 a 10.000 moléculas de acetilcolina (NAGUIB *et al.*, 2002). Isso só é possível por causa de um mecanismo de transporte ativo que transporta a ACh para o interior da vesícula utilizando um gradiente de prótons, que troca dois prótons por uma molécula de ACh (PARSONS *et al.*, 2000).

Após o enchimento das vesículas sinápticas essas são direcionadas para uma região subjacente à membrana sináptica denominada zona ativa onde são utilizadas para as transmissões dos impulsos nervosos. As vesículas são ancoradas à membrana sináptica e se tornam sensíveis às mudanças na concentração intracelular de cálcio. Quando um potencial de ação atinge a terminação nervosa, canais de cálcio ativados por voltagem são abertos. As ondas de cálcio resultantes induzem a fusão de vesículas sinápticas com a membrana e a conseqüentemente liberação da acetilcolina (DOMINGUES, 2006).

A ACh livre no espaço extracelular pode unir-se reversivelmente a receptores específicos pós e pré-sinápticos ou serem hidrolisadas pela enzima AChE (**Figura 5**) em colina e ácido acético (DARVESH *et al.*, 2003).

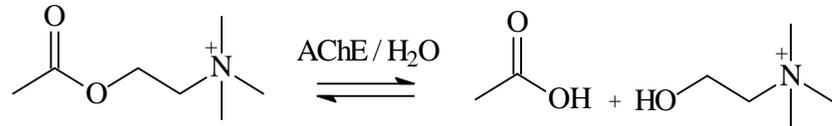


Figura 5: Hidrolise da acetilcolina pela enzima acetilcolinaesterase (AChE).

A colina proveniente da hidrólise é recapturada mediante um sistema de alta afinidade (CHT1) e é reutilizada na síntese da ACh (**Figura 6**). O aumento da atividade neuronal leva à fusão de vesículas sinápticas com a membrana, o que é capaz de aumentar a disponibilidade de moléculas de CHT1 na membrana neuronal. Esse sistema está presente principalmente nos neurônios colinérgicos e é responsável por suprir a colina, por isso, essa etapa é tida como limitante da síntese de ACh (CASTRO, 2006)

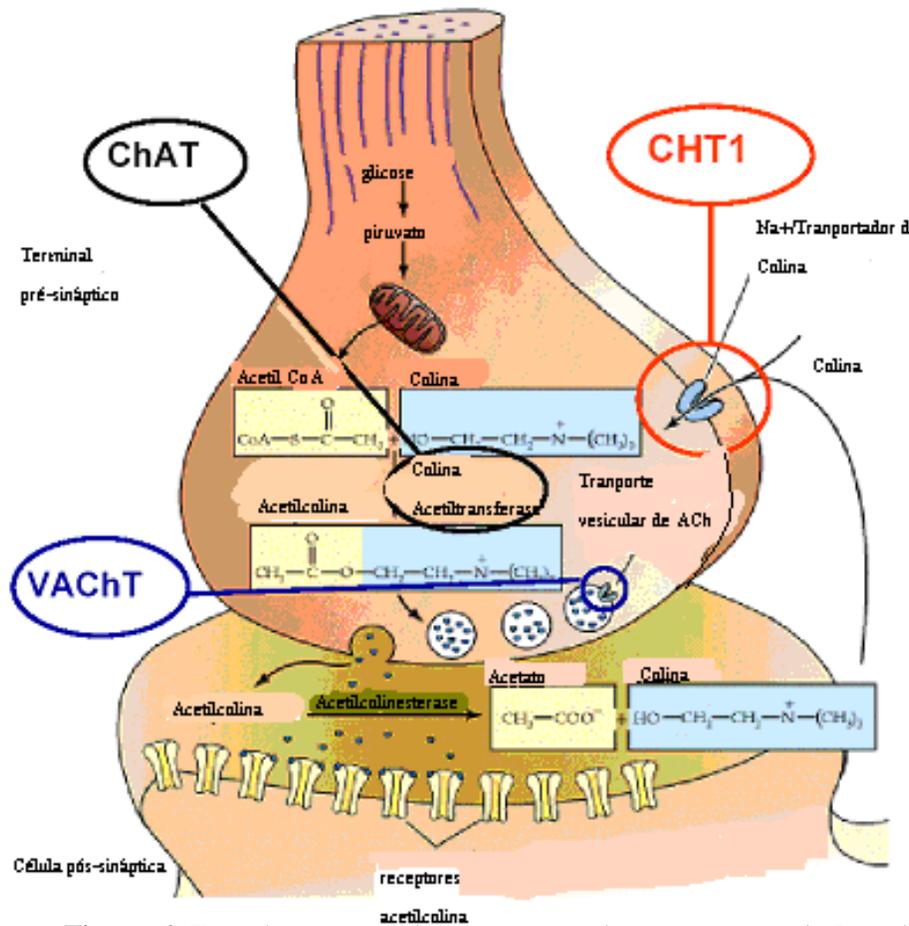


Figura 6: Desenho esquemático representando a neurotransmissão colinérgica (modificado de Purves *et al.*, 2001)

Os receptores pós e pré-sinápticos da ACh são chamados de nicotínicos e muscarínicos de acordo com o alcalóide estimulante (nicotina e muscarina, respectivamente).

Os receptores nicotínicos são proteínas pentaméricas composta de subunidades individuais, as quais se encontram no sistema nervoso central (receptores neuronais), junção muscular (receptores musculares) e nos terminais pós-sinápticos dos gânglios autônomos (receptores ganglionares) e se subdividem em cinco subunidades distribuídas em duas α , uma β , uma δ e uma subunidade ϵ . Essas subunidades possuem uma sequência de 30 a 40% de identidade dos resíduos de aminoácidos homólogos (CASTRO, 2006; ROLE e BERG, 1996; GANDIA, 2002)

Os receptores nicotínicos são amplamente expressos no sistema nervoso central. A inervação colinérgica via receptores nicotínicos regula diferentes processos tais como, liberação de neurotransmissores, excitabilidade celular, e integração neural. Tais ações implicam os receptores nicotínicos em funções e estados fisiológicos como sono, alerta, fadiga, ansiedade, processamento central da dor e uma série de funções cognitivas além de efeitos neuroprotetores e morte celular.(CASTRO, 2006; ROLE e BERG, 1996; GANDIA, 2002)

Os receptores muscarínicos se dividem em 5 subtipos denominados M1, M2, M3, M4 e M5. Os receptores muscarínicos encontram-se no sistema nervoso central e estão envolvidos no controle motor, regulação de temperatura, regulação cardiovascular e memória assim como no sistema nervoso periférico mediando a contração muscular, a secreção glandular e a modulação da força e do ritmo cardíaco, sendo que os receptores M1 e M2 estão presentes em neurônios do SNC e periférico, além de outros tecidos ganglionares (CAULFIELD & BIRDSALL, 1998; OBREGON, 2006)

Como os receptores M2 estão localizados nos terminais de neurônios pré-sinápticos eles são aqueles que parecem estar envolvidos no processo de recaptação de colina (OBREGON, 2006).

A hidrólise da acetilcolina pelas colinesterases é importantíssima, pois é esta reação que regula o efeito desse neurotransmissor, pois caso a acetilcolina permaneça muito tempo ligada a seus receptores, isto causará uma superestimulação no sistema colinérgico, levando a sinais como os que seguem na **Tabela 1** (PRADO *et al.*, 2002; BLOKLAND, 1996; SIDELL, 1994).

Tabela 1 - Principais efeitos da superestimulação da acetilcolina nos seus receptores (SIDEELL,1994)

Receptor	Órgão	Sinais e Sintomas
Central	Sistema nervoso central	Tonteiras, ansiedade, dor de cabeça, tremor, dificuldade de concentração, convulsões, depressão respiratória.
Muscarínico	Glândulas	Corrimento nasal, broncorréia, transpiração, lacrimação, salivação.
	Músculos lisos	Contração pupilar, cólicas, diarreia, micção involuntária.
	Coração	Diminuição do ritmo cardíaco.
Nicotínico	Gânglios autônomos	Palidez, aumento do ritmo cardíaco, hipertensão.
	Músculos	Fraqueza, espasmos.

2.3 - ACETILCOLINAESTERASE

A AChE pertence a uma família de serina hidrolases, dentro da superfamília de alfa/beta (α/β) hidrolases e estão divididas em acetilcolinaesterase, também chamada de colinesterase verdadeira (AChE, E.C. 3.1.1.7) e a butirilcolinaesterase, também chamada de colinesterase não-verdadeira, (BuChE, E.C. 3.1.18) (NARDINI, 1999).

A AChE é encontrada principalmente nas hemáceas e sinapses (terminações nervosas) e músculo estriado enquanto que a BuChE é encontrada principalmente no fígado, no plasma, no pâncreas e no intestino delgado sendo a função desta última ainda desconhecida. Outra diferença entre essas colinesterases está na preferência por seus substratos: a AChE hidrolisa a ACh mais rápido enquanto a BuChE hidrolisa a BuCh mais rápido. (SILVA, 2005).

A AChE foi classificada em diferentes formas moleculares que podem ser divididas em duas classes (Figura 7): as formas homoméricas, existem como monômero (G1), dímero (G2) ou tetrâmero (G4) que se dividem nas formas hidrofílicas e anfifílicas e as formas heteroméricas são agregados de tetrâmeros conectadas por ligações dissulfetos a subunidades lipídicas ligadas ou a uma hélice tripla de subunidade de colágeno. As formas homoméricas

estão presentes no cérebro e suas formas isoméricas estão distribuídas de forma distinta nos neurônios (TAYLOR & RADIC, 1994; DAS *et al.*, 2001).

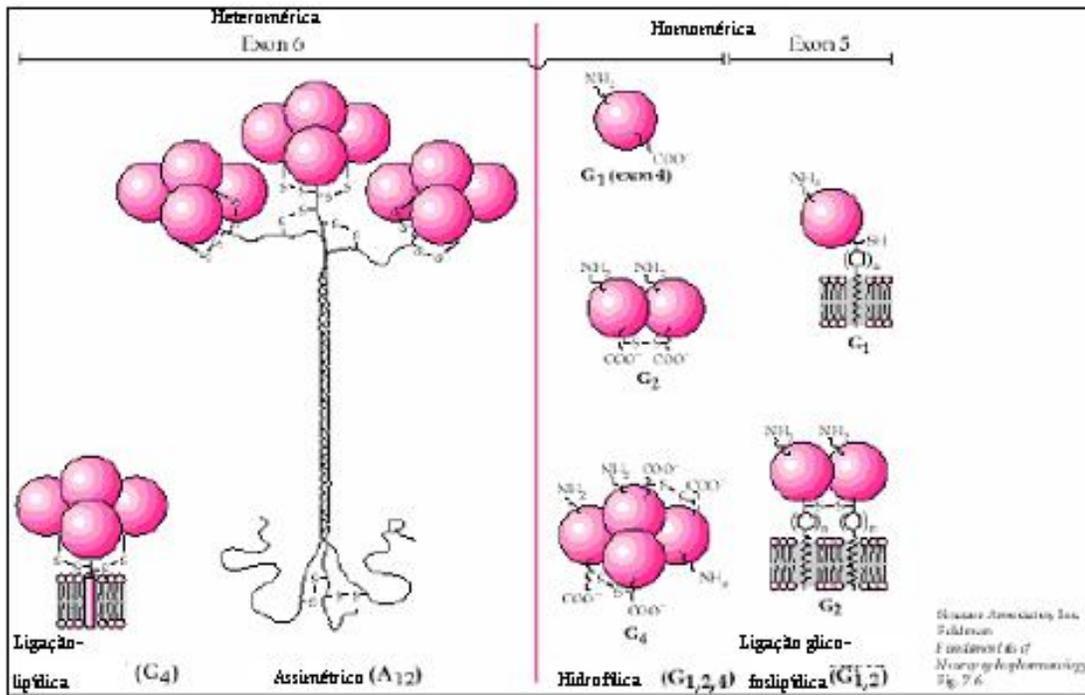


Figura 7: Formas moleculares da acetilcolinaesterase (TAYLOR & RADIC, 1994)

A estrutura cristalografica da AChE (**Figura 8**) determinada primeiramente foi aquela de *Torpedo californica* (TcAChE) encontrada em abundância no órgão de uma espécie de peixe elétrico (SCHUMACHER, 1986). Esta AChE foi também a primeira a ter sua estrutura cristalográfica tridimensional obtida por difração de raio-x (SUSSMAN,1991). Talvez por isso essa seja a estrutura mais utilizada em estudos experimentais e teóricos.

O sitio ativo da AChE encontra-se no interior de um estreito e irregular canal de 20Å de profundidade. As dimensões da AChE de *Torpedo californica* são 45Å x 60Å x 65Å e ela possui 537 resíduos de aminoácidos dispostos em 12 folhas beta cercada por 14 alfa-hélices (CASTRO, 2002).

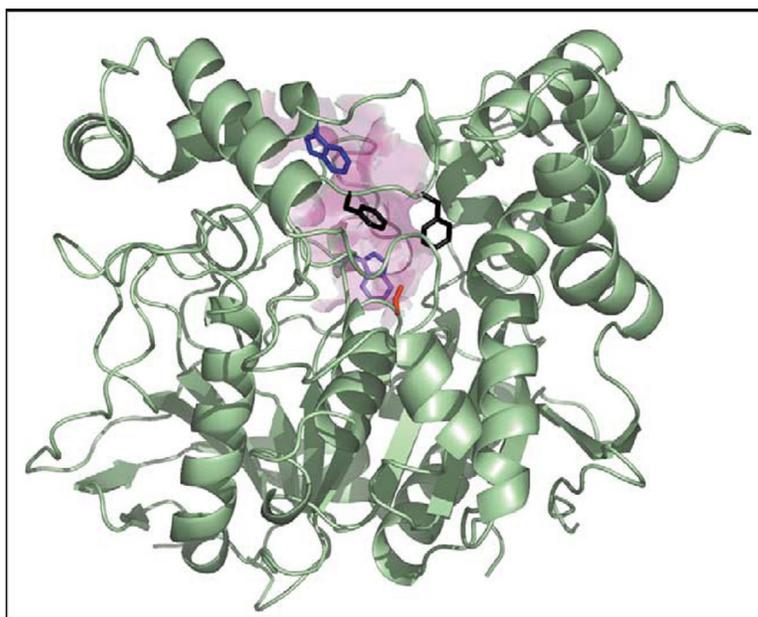


Figura 8: Estrutura tridimensional da acetilcolinaesterase de *Torpedo californica*. (SILMAN e SUSSMAN, 2005).

Seu canal irregular possui um diâmetro médio de 4,4Å que é inferior ao diâmetro de van der Waals do grupo tetrametilamônio da acetilcolina (6,4Å). Isso indica a necessidade de uma flexibilidade conformacional das paredes do canal e/ou a existência de outras rotas para o acesso do substrato até a tríade catalítica do sítio ativo da enzima, e para a liberação dos produtos (CASTRO, 2002)

Na parede do canal encontram-se principalmente resíduos aromáticos e uns poucos resíduos ácidos, os quais parecem ser importantes na orientação do substrato ao sítio ativo (SILVA, 2005).

O sítio compreende um subsítio esterásico, o qual contém a tríade catalítica Ser200, His440 e Glu327 que se apresentam separados por distâncias características de ligação hidrogênio. As outras hidrolases possuem em suas tríades um resíduo de Asp ao invés de Glu. A His440 protonada, formada a partir da transferência do próton da Ser200, é estabilizada pelos resíduos Glu327 da tríade catalítica (principalmente) e Glu199. A modificação do Glu199 por técnicas de mutagênese mostrou que sua substituição afeta as etapas de acilação e desacilação da catálise por AChE (TÕUGU, 2001).

A AChE possui também uma cavidade oxianion (oxyanion hole) que é formada pelos dipolos N-H da cadeia principal de Gly118, Gly119 e Ala201 e que tem a função de estabilizar o estado de transição C-O⁻ proveniente do grupo C=O da acetilcolina. Na

superfície ou borda do canal, acerca de 14Å do sitio ativo, existe um segundo sitio ligante chamado de sitio aniônico periférico, responsável pela inibição por substratos. Este segundo subsítio é composto pelos resíduos Tyr70, Tyr121 e Trp279 (**Figura 9**) (ORDENTLICH, 1998).

O grupo colina ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{Me}_3$) interage com os resíduos Trp84, Phe330 e Glu199 (subsítio aniônico). Através das estruturas de raio-x foi possível verificar que o resíduo do aminoácido Trp84 está em uma posição espacialmente favorável a interações com a parte catiônica da acetilcolina estabilizando o complexo AChE-acetilcolina através de interações cátion- π (BARRIL *et al.*, 2001).

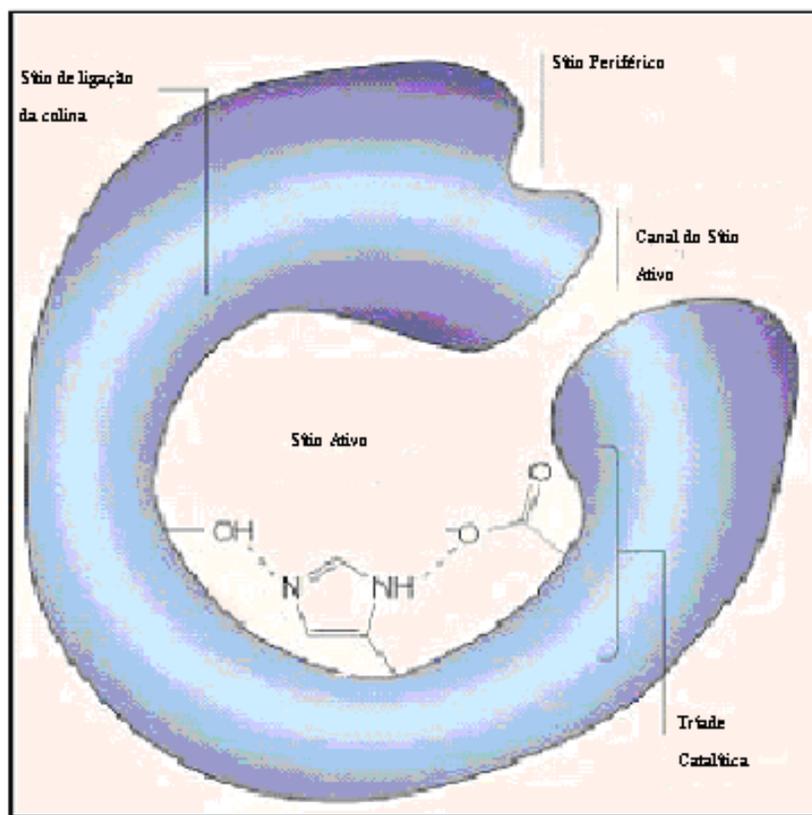


Figura 9: Sítio catalítico da AChE. (adaptado de Soreq & Seidma, 2001)

Os resíduos Phe288 e Phe290 (denominados acyl pocket – cavidade acila) são responsáveis, por impedimento estérico, pela especificidade da AChE em relação ao grupo acila do substrato (HOSEA, 1995). À medida que a reatividade do substrato diminui (grupo acila maior que propanoila), o mecanismo de hidrólise muda gradualmente da utilização da tríade catalítica para uma catálise ácido-base envolvendo o resíduo Glu199 (SELWOOD, 1993).

O canal do sitio ativo da TcAChE apresenta 28 sitios de hidratação, dos quais 20 encontram-se ocupados na forma nativa. Estes sitios incluem regiões polares, de onde as moléculas de água geralmente não são deslocadas, com exceção da molécula localizada na cavidade oxianion (no caso de inibidores que formam um estado de transição tetraédrico), e regiões hidrofóbicas, de onde as moléculas de água são facilmente deslocadas, especialmente quando substituídas por interações cátion- π (KOELLNER *et al.*, 2000).

A AChE possui um forte momento de dipolo alinhado com o eixo do canal do sitio ativo, de forma a atrair um substrato catiônico em direção à tríade catalítica, que contribui para sua alta eficiência (BOTTI, 1999).

A cinética é uma ferramenta importante para o estudo dos mecanismos enzimáticos, e não poderia ser diferente para a AChE já que a maioria das enzimas tem propriedades cinéticas em comum. Ao longo da reação à medida que a concentração do substrato aumenta, a atividade catalítica de uma concentração fixa de uma enzima aumenta de forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) característica, na qual toda enzima está no forma do complexo ES. A concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis, K_m , que é característica para cada enzima agindo sobre um determinado substrato. A equação de Michaelis-Menten que pode ser escrita na forma

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]},$$

relaciona a velocidade inicial (V_0) de uma reação enzimática com a concentração de substrato $[S]$ e a V_{max} , por meio da constante de Michaelis. Todos esses termos podem ser medidos experimentalmente. Eles têm significados diferentes para enzimas diferentes. Em condições de saturação, a velocidade limite de uma reação catalisada enzimaticamente é descrita pela constante k_{cat} , que é uma constante de primeira ordem. Ela também é chamada de número de renovação. A relação k_{cat}/K_m fornece uma boa medida de eficiência catalítica. A equação de Michaelis-Menten é também aplicável às reações com dois substratos, que ocorrem ou pela formação de um complexo ternário ou por uma dupla-troca. Cada enzima tem um pH ótimo (ou intervalo de pH) no qual apresenta atividade máxima (LEHNINGER, 2006).

A hidrólise da acetilcolina pela AChE segue um esquema cinético reacional de três etapas; a reação ocorre, após a ligação reversível do substrato, em duas etapas sucessivas de acilação e desacilação (Figura 10).

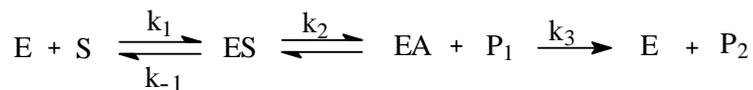


Figura 10: Mecanismo genérico de acilação e desacilação da ACh e outros substratos.

Desta forma temos os seguintes parâmetros cinéticos:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$$

Para a acetilcolina (ROSENBERRY, 1975; FUXREITER, 1998):

$$k_{cat} = 1,4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$$

$$K_m = 9 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$k_{cat}/K_m = 1,6 \times 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$$

A eficiência catalítica da reação catalisada pela AChE ainda é um grande desafio, isso por que a avaliação e a comparação dos resultados de diferentes estudos com a AChE são complexas devido a presença do polimorfismo da enzima (diferentes formas e variabilidade de espécie para espécie). Os valores de k_{cat} e K_m estão entre os mais altos já conhecidos, indicando que a reação é limitada pela difusão do substrato (TÕUGU., 2001; FERSHT,1999).

A compreensão dos efeitos do mecanismo baseado na inibição da AChE é muito utilizada na fabricação de inseticidas, pesticidas, fármacos e infelizmente como arma química, mas essas não são as únicas razões pela qual a AChE é alvo de grande interesse na pesquisa. Uma outra razão é que a AChE hidrolisa a ACh numa velocidade muito alta, atingindo o limite de difusão do substrato e do “maquinário catalítico” das “enzimas de serina”, isso ocorrendo porque todas as etapas de modificação do substrato – associação do substrato,

transformação química e dissociação dos produtos acontecem em velocidades semelhantes (TÕUGU, 2001).

Em vista disto, durante vários anos, pesquisas utilizaram-se de estruturas cristalográficas de raios-x para elucidar as interações da AChE e AChE complexada com vários inibidores, além de outros estudos utilizando a cinética clássica, resultados físico-químicos e mutagênese direcionada ao sítio. Essas informações estruturais nos permitem verificar a suposta interação entre resíduos de aminoácidos específicos na ligação do substrato com a enzima e calcular as barreiras de energia do mecanismo de ação da AChE com novos inibidores.

2.4 - INIBIDORES ACETILCOLINAESTERASE

Os inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem com a catálise, diminuindo ou parando as reações enzimáticas. Há duas grandes classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis (LEHNINGER, 2006).

Existem três tipos de inibição reversível: a chamada competitiva, incompetitiva e mista. Um inibidor competitivo compete com o substrato para o sítio ativo de uma enzima. Enquanto o inibidor estiver ocupando o sítio ativo, ele impede a ligação do substrato à enzima. Um inibidor incompetitivo liga-se a um sítio distinto do sítio ativo do substrato e, ao contrário do inibidor competitivo, liga-se apenas no complexo ES. Um inibidor misto também se liga em um sítio distinto do sítio ativo do substrato, mas ele se liga tanto em E quanto em ES. Já a inibição irreversível é aquela em que o inibidor se liga de forma covalente com, ou destrói um grupo funcional da enzima, que é essencial para a sua atividade, ou ainda formam uma associação não-covalente particularmente estável (LEHNINGER, 2006).

Os inibidores das acetilcolinaesterases (IACHÉ) são as principais drogas hoje licenciadas para o tratamento específico do MA. Seu mecanismo baseia-se no princípio do déficit colinérgico decorrente da doença, e busca aumentar a disponibilidade da acetilcolina nas terminações sinápticas colinérgicas. Os IACHÉ são classificados com base na sua reversibilidade e duração da inibição das colinesterases como: reversíveis, irreversíveis, pseudo irreversíveis e tipo análogos de estado de transição (MARCO, 2002; FORLENZA, 2005).

O 1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina genericamente chamado de tacrina (**Figura 11**, nº1), pertence ao grupo de inibidores reversíveis e foi o primeiro fármaco aprovado pela FDA

(United States Food and Drug Administration) em 1993 e comercializado pelo nome de Cognex®. Usada por pacientes em estágios moderados da doença, não possui seletividade para as colinesterases, sendo mais potente sobre a BuChE que sobre a AChE. Apresenta vida média curta, tendo por isso que ser administrado quatro vezes ao dia. Possui alta hepatotoxicidade, além de efeitos colaterais indesejáveis como, por exemplo, náuseas/vômitos e diarreia. Esses efeitos colaterais fizeram com que fosse retirado progressivamente do mercado (ALMEIDA, 1998; GANDIA, 2002; FORLENZA, 2005; GOMES & KOSZUOSKI, 2005).

Em análises feitas por cristalografia de raios-x dos complexos tacrina-AChE observou-se que a tacrina se encontra paralela entre os resíduos dos aminoácidos Trp84 e Phe330, e que o átomo de nitrogênio heterocíclico forma uma ligação hidrogênio com o grupo carbonila da cadeia lateral do resíduo de aminoácido His440, e que o grupo amino forma uma ligação hidrogênio com uma molécula de água (MARCO, 2002; BARRIL *et al.*, 2001).

Sua estrutura foi usada como modelo para propor muitas estruturas análogas na intenção de produzir substâncias com toxicidades mais baixas, menos efeitos colaterais e que fossem mais potentes (MARCO, 2002; BARRIL *et al.*, 2001).

O inibidor (*R,S*)-1-benzil-4-[(5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il]-metilpiperidina, trivialmente conhecido como donepezil (**Figura 11**, nº2) e comercializado com o nome de Aricept®, pertence a uma segunda geração de inibidores reversíveis e foi a segunda molécula aprovada pela FDA em 1997. Seu uso foi administrado para tratamentos de formas mais graves do MA. Este inibidor é altamente seletivo, afetando muito pouco outras colinesterases e possuindo uma vida média mais prolongada, o que permite uma administração diária de apenas uma dose, além de menos efeitos colaterais (INOUYE & OLIVEIRA, 2004; ALMEIDA, 1998; GOMES & KOSZUOSKI, 2005; ENGELHARDT *et al.*, 2005).

Os efeitos adversos observados entre os pacientes tratados com placebo e donepezil nas doses de 5 e 10 mg ao dia estão listados na **Tabela 2** abaixo:

Tabela 2: Porcentagem de efeitos adversos decorrentes do tratamento com placebo ou donepezil entre pacientes com Mal de Alzheimer (INOUYE & OLIVEIRA, 2004; ALMEIDA, 1998)

Efeitos Adversos	Placebo n= 162 (%)	Donepezil (%) 5mg/dia n=154	Donepezil (%) 10mg/dia n=157
Fadiga	2	5	8
Diarréia	7	9	17
Náusea	4	4	17
Vômito	2	3	10
Anorexia	2	2	7
Cãibras	1	6	8
Tontura	4	10	8
Rinite	2	1	6

As análises de cristalografia dos complexos donepezil-AChE mostraram que o donepezil possui uma orientação situada desde o centro aniônico do sitio ativo até o sitio periférico da AChE e faz interações com resíduos aromáticos de diferentes aminoácidos e moléculas de água e o grupo benzil se encontra em posição paralela originando uma interação π - π com anel indólico do Tr279 no sitio periférico (MARCO, 2002).

O primeiro inibidor da AChE clinicamente estudado foi a fisostigmina (**Figura 11**, nº3), que faz parte do grupo de inibidores pseudo-reversíveis, que inclui um grupo de carbamatos. Seus estudos foram interrompidos por causa da sua meia vida curta, disponibilidade variável e uso terapêutico estreito. O nome pseudo-reversível vem da formação de um complexo formado pela ligação do resíduo Ser200 com a molécula de inibidor. Essa ligação é hidrolisada mais lentamente do que a forma acetilada resultante da interação com a ACh (MARCO, 2002; FORLENZA, 2005; BELEDO, 1998).

Existe uma linha de pesquisa que considera os carbamatos inibidores reversíveis apesar destes levarem mais tempo para a descarbamilação, em média de 30 a 40 minutos para ocorrer (OREGON, 2006).

A partir deste composto, iniciaram-se estudos com moléculas relacionadas chamadas carbamatos de segunda geração, entre elas a mais conhecida é a chamada genericamente rivastigmina (**Figura 11**, nº4), (+)-(S)-N-etil-3-[(1-dimetilamino)etil]-N-metil-fenilcarbamato, que é comercializada com o nome de Exelon®. Esse foi o terceiro inibidor aprovado pela

FDA em 1998 e é seletivo para a AChE (MARCO, 2002). Os principais efeitos adversos associados ao uso da rivastigmina foram cefaléia, náusea, tontura e diarreia (ALMEIDA, 1998).

O último inibidor aprovado pelo FDA, em 2001, conhecido genericamente de galantamina (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexaidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2,-ef][2]benzazepin-6-ol (**Figura 11**, nº5) e comercializado com o nome de Remynil®, é um alcalóide isolado de flores e bulbo da *Galanthus woronowii* (amarillidaceae), sendo mais tarde sintetizado. A galantamina é um inibidor reversível, competitivo e tem demonstrado ser um modulador alostérico dos receptores nicotínicos (INOUE & OLIVEIRA, 2004; ENGELHARDT *et al.*, 2005; GANDIA, 2002; GOMES & KOSZUOSKI, 2005)

A galantamina se liga na base do sítio ativo da enzima interagindo com a cavidade acil e com o resíduo que interage com o grupo amônio quaternário, porém a amina terciária interage por meio de uma molécula de água com os resíduos do Trp84 e phe330 (MARCO, 2002).

Um outro alcalóide considerado um potente e seletivo inibidor é a huperzina A (**Figura 11**, nº6), isolado da *Huperzia serrata*, uma planta muito usada na medicina chinesa. Apesar de não ter sido ainda aprovado pela FDA, tem baixa toxicidade e aumenta as funções cognitivas em humanos e animais (OBREGON, 2006).

A partir desta estrutura muitos compostos foram preparados a fim de se produzir melhores compostos, entre eles podemos destacar os híbridos da huperzina e tacrina conhecidos como huprinas. Dos inúmeros resultados vale a pena destacar a huprina X e a huprina Y (**Figura 11**, nº7) por terem sido considerados mais potentes e seletivos. A Huprina X pode ultrapassar a barreira hematocefálica e se ligar à AChE de humanos com uma constante de inibição de 26 pM (MARCO, 2002; BARRIL *et al.*, 2001).

Os inibidores tipo análogos de estado de transição formam uma estrutura tetraédrica parecida com o estado de transição do substrato original acetilcolina. O *m*-(*N,N,N*,-trimetilamônio)trifluoroacetofenona (**Figura 11**, nº8) é um exemplo dessa classe de inibidores poderosos, sendo que seu caráter iônico impede que este composto ultrapasse a barreira hematocefálica (MARCO, 2002).

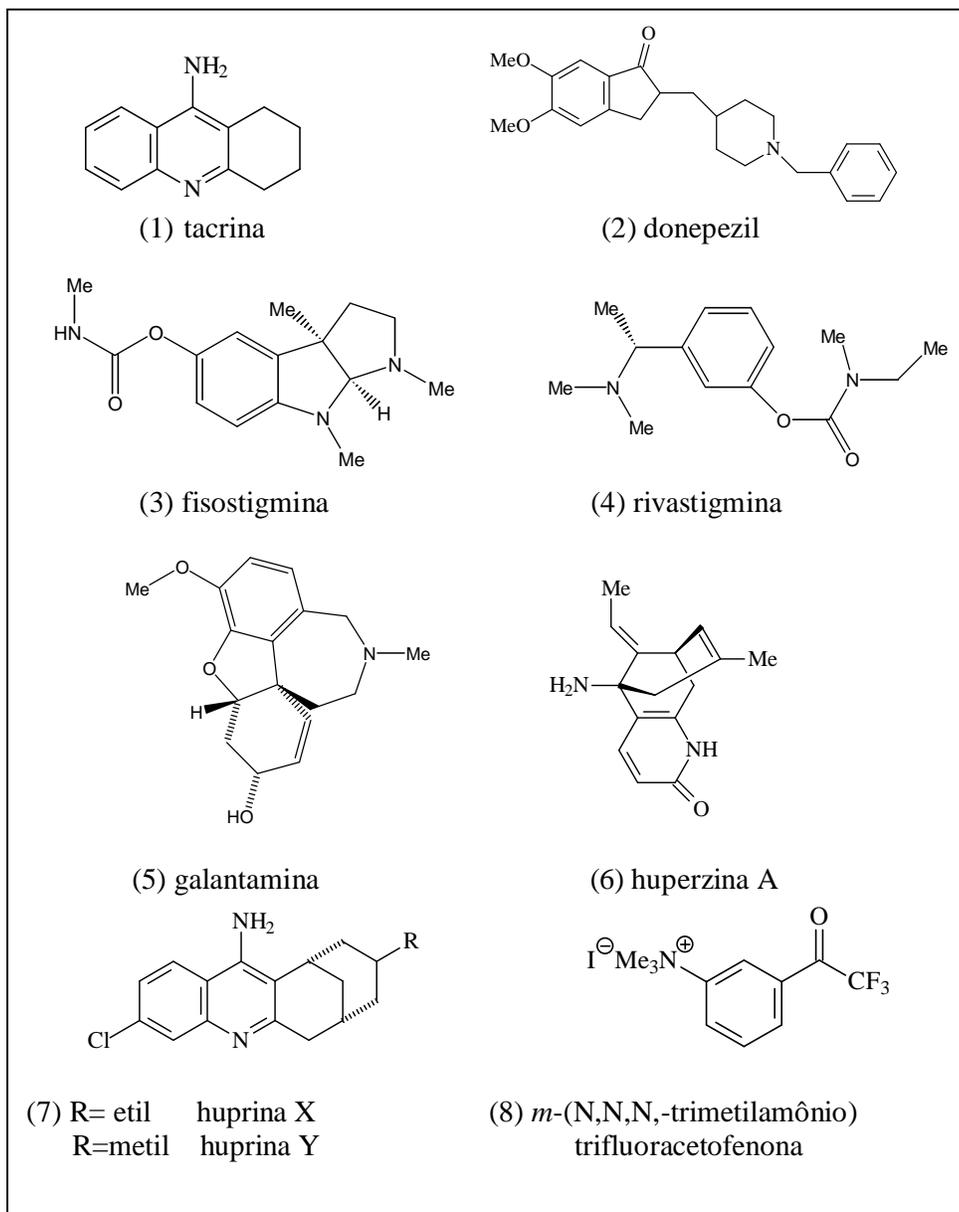


Figura 11: Inibidores da enzima acetilcolinaesterase.

2.5 – POLICETÍDEOS

A natureza oferece uma gama enorme e inestimável de substâncias com atividades biológicas para serem utilizados como fármacos para inúmeras doenças, dentre elas o Mal de Alzheimer. A busca por inibidores naturais para o Mal de Alzheimer tem sido bastante intensificada nos últimos anos, não só pelo fato de que os fármacos hoje disponíveis no mercado possuem preços relativamente onerosos como também por causarem aos pacientes

reações adversas desconfortáveis como, por exemplo, a alta hepatotoxicidade (JUNIOR *et al.*, 2004; TREVISAN & MACEDO, 2003; FILHO *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2005; TREVISAN *et al.*, 2006).

Espécies de policetídeos fúngicos e marinhos têm-se demonstrado uma rica fonte de substâncias com atividades biológicas (SEPČÍČ *et al.*, 1998; SEPČÍČ *et al.*, 1999; PASTRE *et al.*, 2007). As esponjas marinhas do gênero *Plakortis* têm contribuído significativamente, demonstrando atividades: antibacteriana, leishmanicida, citotóxica e anticolinesterásica não seletiva (EPIFANIO, 2005; CARVALHO *et al.*, 2006; KOSSUGA *et al.*, 2007).

Os policetídeos são substâncias naturais sintetizadas a partir de ácido acético ou seu equivalente biossintético, AcCoA, através de condensação de Claisen, que fornece β -ceto ésteres, que por redução e repetidas condensações fornecem ácidos graxos ou policetídeos (TORSSELL, 1983).

Os policetídeos estudados neste trabalho foram extraídos da esponja marinha *Plakortis angulopiculatos*, coletada no litoral de Fernando de Noronha e Tamandaré (Pernambuco). Foram isolados três compostos: o policetídeo 1 (2Z,6R,8S) [3,5-dietil-5-(2-etil-hexil)-5H-furano-2-ilideno]-ácido acético metil éster (**Figura 12**, nº 01), o policetídeo 2 (2Z,6R,8S)[3-etil-5-(2-etil-hexil)-5-metil-5H-furano-2-ilideno]-ácido acético metil éster (**Figura 12**, nº 02) e o policetídeo 3 (2Z,6R, 8R,9E) [3-etil-5-(2-etil-hex-3-enil)-5-metil-5H-furano-2-ilideno]-ácido acético metil éster (**Figura 12**, nº 03) (EPIFANIO *et al.*, 2005).

A atividade colinesterásica destas substâncias foi detectada através de métodos analíticos e do método de Ellman *et al.* (CARVALHO, 2006). Segundo Silva *et al.*, 2006 o método de Ellman é um procedimento fidedigno para atividade de colinesterases e pode ser rotineiramente empregado para avaliar a atividade inibitória da AChE de compostos desconhecidos.

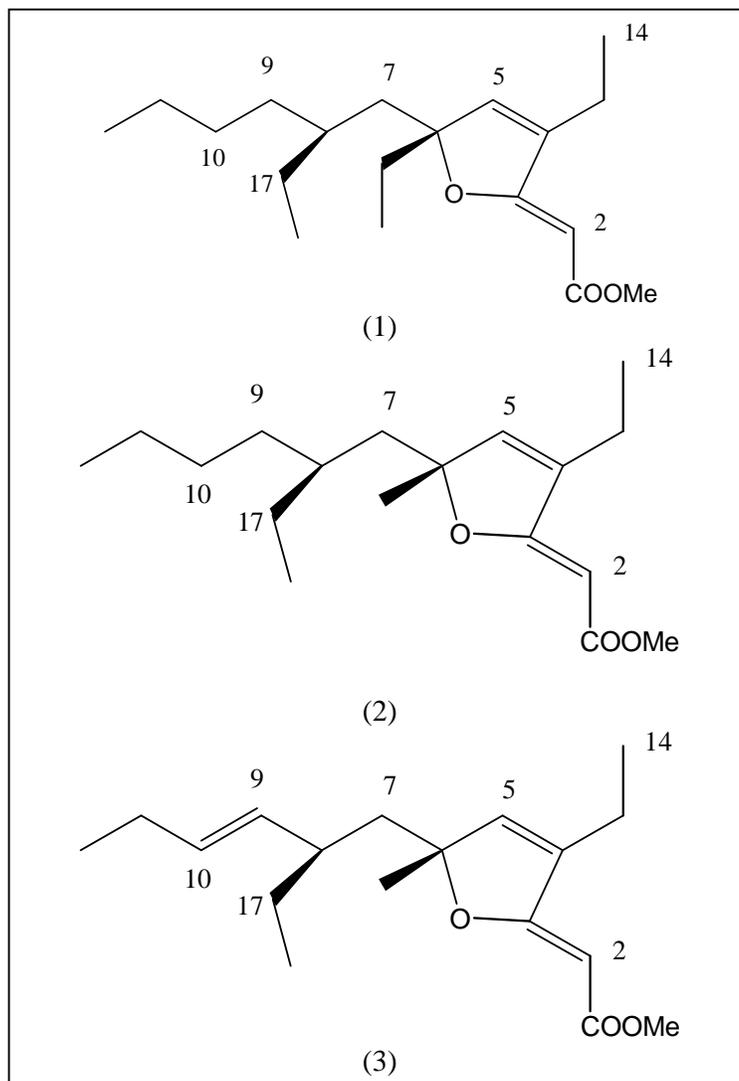


Figura 12: Policetídeos 1, 2 e 3

2.6 – MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL

Um dos maiores interesses da química computacional é estudar sistemas moleculares onde podemos realizar sobre eles diversos cálculos, seja por mecânica quântica, mecânica molecular ou outros métodos computacionais que predigam o comportamento destes sistemas moleculares.

A escolha do método utilizado dependerá do tipo de estudo a que estamos nos propondo, mas podemos dividir esses métodos em dois grandes grupos genéricos que são: os métodos clássicos como a mecânica molecular e os métodos quanto-mecânicos, como os métodos empíricos, semi-empíricos e *ab initio*.

Os métodos semi-empíricos provêm diretamente da utilização do método HARTREE-FOCK (HF) como modelo de resolução da equação de auto-valor para a energia do sistema e são utilizados na sua grande maioria na tentativa de descrever sistemas moleculares de grandes dimensões. Na literatura já se encontram cálculos completos de orbital molecular de sistemas, tais como: conjunto de proteínas, DNA, polissacarídeos, além de cálculos de pKa de proteínas, do estudo dos mecanismos de reação enzimática entre outros (MORGON & COUTINHO, 2007).

A utilização do modelo HF *ab initio* é inviável nestes casos já que o custo computacional de um cálculo HF cresce com a quarta potência do número de funções base. Este aumento é proveniente das integrais bieletrônicas necessárias para a construção da matriz de Fock. Os métodos semi-empíricos diminuem o custo computacional, reduzindo o número destas integrais. O tratamento dos sistemas moleculares fica restrito a análise quanto-mecânica dos elétrons de valência (considerando os demais elétrons parte fixa do núcleo), bem como a utilização de um conjunto de bases mínimas em sua descrição (JENSEN, 1999).

Elementos do primeiro período da tabela periódica incluem funções simples do tipo s e um conjunto de funções do tipo p, por exemplo 2s, 2p_x, 2p_y, 2p_z; para elementos de transição um conjunto de funções do tipo d, por exemplo, 3d(x²-y²), 3d(z²), etc, sendo que para o hidrogênio a representação é apenas um função simples do tipo 1s (MORGON & COUTINHO, 2007).

Entre alguns métodos semi-empíricos muito utilizados podemos citar o Método de Hückel Simples, Método de Hückel estendido, o método ZDO (Zero Differential overlap), o método CNDO (Complete Neglect Differential Overlap), o método INDO (Intermediate Neglect Differential Overlap), o método MNDO (Modified Neglect Differential Overlap), AM1 (Austin model 1), PM3, PM5, PM6, entre outros.

O método MNDO descreve os elementos da matriz de Fock para camadas fechadas e para átomos possuindo um orbital s e três p para cada átomo, exceto para o hidrogênio, como segue na equação abaixo quando os elementos da diagonal principal da matriz de Fock possuir $\mu = \nu$

$$F_{\mu\mu} = H_{\mu\mu} + \sum_{\nu}^A P_{\nu\nu} \left[\langle \mu\mu|\nu\nu \rangle - \frac{1}{2} \langle \mu\nu|\mu\nu \rangle \right] + \sum_B \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} \langle \mu\mu|\lambda\sigma \rangle$$

Já no caso onde os elementos μ e ν sejam diferentes mas localizados no mesmo centro, ou seja, fora da diagonal utilizaremos a equação abaixo:

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} + \frac{1}{2} P_{\mu\nu} \left[3 \langle \mu\nu|\mu\nu \rangle - \langle \mu\mu|\nu\nu \rangle \right] + \sum_B \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} \langle \mu\nu|\lambda\sigma \rangle \quad \therefore \mu, \nu \in A$$

E quando μ e λ estiverem em centros diferentes os elementos da matriz de Fock serão obtidos através da equação abaixo:

$$F_{\mu\lambda} = H_{\mu\nu} - \frac{1}{2} \sum_{\nu}^A \sum_{\nu}^B P_{\nu\sigma} \langle \mu\nu|\lambda\sigma \rangle \quad \therefore \mu \in A \quad \lambda \in B$$

Onde:

$$P_{\lambda\sigma} = \sum_i^{occ} c_{\lambda i}^* c_{\sigma i}$$

$P_{\mu\nu}$ é a matriz de ordem de ligação;

$H_{\mu\mu}$ são as energias monoelétrônicas de um centro;

$\langle \mu\mu|\nu\nu \rangle$ e $\langle \mu\nu|\mu\nu \rangle$ são integrais de Coulomb e de troca, respectivamente;

$H_{\mu\lambda}$ são as integrais de ressonância de dois centros;

$V_{\mu\nu}$, B representa o termo de atração eletrostática;

$\langle \mu\nu|\lambda\sigma \rangle$ são as integrais de repulsão de dois centros.

A partir do conhecimento da matriz de Fock e da matriz densidade podemos obter a energia total do sistema, que é escrita como a soma da energia eletrônica e as repulsões $E_{AB}^{caroço}$ entre os “caroços” dos átomos A e B:

$$E_{total}^{mol} = E_{el} + \sum_{A < B} \sum E_{AB}^{caroço}$$

E posteriormente obter-se o calor de formação molecular C_F que é dado por:

$$C_F^{mol} = E_{total}^{mol} - \sum_A E_{el}^A + \sum_A C_F^A$$

onde o calor de formação é obtido a partir de uma transformação simples da energia total molecular E_{total} , utilizando-se de dados experimentais ou expressões semiempírica que contenham parâmetros ajustáveis aos dados experimentais.

Os termos no método MNDO experimentais monoatômicos de repulsão eletrônica são obtidos através de vários estados de valência do átomo e seus íons, sendo que para cada átomo usa-se uma base mínima formada de orbitais s e p perfazendo um total máximo de 5 integrais, sendo elas:

$$G_{ss} = \langle ss|ss \rangle, \quad G_{pp} = \langle pp|pp \rangle, \quad H_{sp} = \langle sp|sp \rangle, \quad G_{sp} = \langle ss|pp \rangle \quad \text{e} \quad G_{p_2} = \langle pp|p'p' \rangle$$

Já em relação às integrais diatômicas de repulsão eletrônica elas existem num total de 22 tipos distintos para cada par de átomos pesados e representam a energia de interação de carga ($e\varphi_\mu\varphi_\nu$) no átomo A e ($e\varphi_\lambda\varphi_\sigma$) no átomo B, interagindo assim entre si. Estas integrais são iguais a soma sobre todas as interações de momentos de multipolo de duas distribuições de carga M_{lm} com l e m especificando a ordem e orientação dos mesmos.

Desta forma as integrais de dois elétrons considerando esta expansão de multipolos são dadas por:

$$\langle \mu\nu|\lambda\sigma \rangle = \sum_{l|2m} M_{l_1m}^A, M_{l_2m}^B \quad 3$$

$$M \left[\begin{matrix} A & B \\ l_{1m} & l_{2m} \end{matrix} \right] = \frac{e^2}{2^{l_1+l_2}} \sum_{i=1}^{2l_1} \sum_{j=1}^{2l_2} f_1(R_{ij})$$

e R_{ij} representa a distância entre os pontos de carga i e j nas configurações integrantes dos átomos A e B.

Os termos de atração elétron-carço e repulsão carço-carço também serão parametrizados através de parâmetros ajustáveis.

Apesar de o método MNDO corrigir muitos problemas apresentados pelo MINDO/3, o método ainda continha erros consideráveis, como por exemplo, a dificuldade em descrever ligações hidrogênio, o que é de extrema importância em processos biológicos, além de superestimar as repulsões entre átomos não ligados.

Com isso tornou-se novamente necessário corrigir tais defeitos criando-se um novo método a partir do MNDO o AM1 (considerado o segundo parâmetro do MNDO). A função de repulsão de carço (CRF) do AM1 é dada como segue abaixo:

$$CRF(AB) = Z_A Z_B \gamma_{ss} [1 + F(A) + F(B)],$$

onde

$$F(A) = \exp(-\alpha_A R_{AB}) + \sum_i K_{Ai} \exp[L_{Ai} (R_{AB} - R_{Ai})^2]$$

$$F(B) = \exp(-\alpha_B R_{AB}) + \sum_j K_{Bj} \exp[L_{AB} (R_{AB} - M_{Bj})^2]$$

Z_A e Z_B são os átomos dos núcleos A e B, respectivamente.

L representa parâmetros que determinam as larguras das funções Gaussianas utilizadas na parametrização. M e K são parâmetros que foram otimizados.

O método utilizado neste trabalho foi o PM3 que também é baseado no MNDO, daí surgiu o seu nome que significa terceira parametrização do MNDO. Todos esses métodos citados acima diferem apenas pelas simplificações utilizadas na resolução das integrais e pela forma como as parametrizam. No método PM3 todos os parâmetros são ajustados de forma a reproduzir dados experimentais enquanto que o AM1 além de utilizar os dados experimentais utiliza-se também da intuição química. O método PM3 mostrou-se em muitos casos melhor que o AM1, principalmente naqueles onde há interações por ligações hidrogênio.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

O modelo enzimático utilizado como referência para este trabalho foi construído a partir da estrutura cristalográfica da enzima AChE de *Torpedo californica* complexada com o inibidor *m*-(*N,N,N*-trimetilamônio)-2,2,2-trifluoroacetofenona (TMTFA), de código 1AMN no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (**Figura 13**).

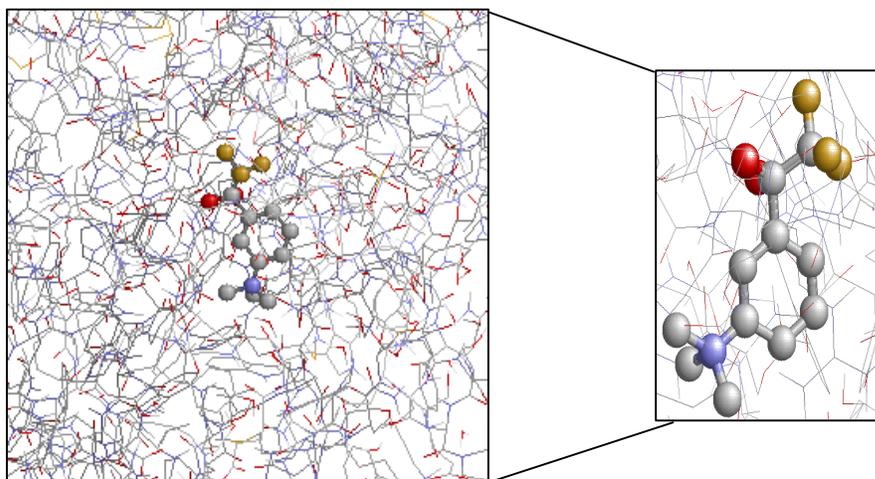


Figura 13: Enzima AChE de código 1AMN com o inibidor *m*-(*N,N,N*-trimetilamônio)-2,2,2-trifluoroacetofenona (TMTFA)

Foram considerados no modelo do sítio ativo desta enzima aqueles aminoácidos com pelo menos um átomo na esfera de raio de 4,5Å do inibidor selecionado, através do programa RasMol 2.7.2.1.1. Moléculas de água também foram consideradas, baseando-se em sua proximidade com os aminoácidos selecionados. O modelo final foi composto pelas coordenadas cartesianas para os aminoácidos Glu327, Glu199, Phe331, Phe288, Phe290, Phe330, Trp84, Trp233, Ser226, Ser200, His440, Tyr121, Gly119, Gly118, Gly118 e Ala201 além de quatro moléculas de água (602, 616, 630 e 641). O arquivo 1AMN nos oferece os aminoácidos acompanhados dos seus respectivos átomos de hidrogênio; os átomos de hidrogênio das moléculas de água foram adicionados através do programa PC Spartan Pro (Wavefunction Inc.). O inibidor TMTFA foi eliminado e os átomos pertencentes às ligações peptídicas foram fixados e a estrutura foi minimizada por cálculos de MM (MMFF) no programa PC Spartan Pro. A estrutura minimizada foi gravada no formato PDB. O arquivo pdb criado foi editado no bloco de notas e todos os átomos pertencentes às ligações peptídicas (identificadas pela sequência CCNO) foram colocados em sequência no início da matriz, que

logo depois foi gravada no programa Babel 1.6 [Walters e Stahl, 1996] no formato MOPAC (coordenadas internas) através da linha de comando do DOS:

```
babel -ipdb [nome do arquivo].pdb -omopint [nome do arquivo].mop
```

Na sequência, o arquivo foi editado no bloco de notas e fixados distâncias, ângulos e diedros colocando-se o número zero no lugar do 1 para os átomos da ligação peptídica. Para otimizar a geometria do sistema utilizou-se a linha de comando com as palavras chaves:

```
PM3 GRAD NOINTER NOLOG EF MMOK CHARGE=n T=n, onde
```

PM3 = hamiltoniano

GRAD = imprimir todos os gradientes

NOINTER = não imprimir as distâncias interatômicas

NOLOG = não mostrar o arquivo de saída, sempre que for possível

EF = usar a rotina EF na pesquisa de mínimo

MMOK = usar correção de mecânica molecular em ligações CONH

CHARGE = define a carga total n do sistema

T = tempo requerido para o programa executar os cálculos em n dias

Novos cálculos para o sitio ativo da enzima foram realizados agora com o método semi-empírico PM3, através do programa Mopac6.0. Esse sitio ativo vazio gerado se denominará a partir de agora como sitio 1, e nele encontramos os resíduos Ser200 e His440 ambos neutros.

As moléculas dos policetídeos (**Figura 12**) foram editadas como estruturas isoladas no programa PC Spartan Pro, minimizadas por cálculos de MM (MMFF) e gravadas no formato PDB. Na sequência, o arquivo foi editado no bloco de notas sendo que para essas estruturas as distâncias, ângulos e diedros não foram fixados, logo após cálculos semi-empíricos, com o programa MOPAC6.0 foram realizados utilizando-se a mesma linha de comando descrita anteriormente.

Editou-se a estrutura do sitio 1 já otimizado no Programa PC Spartan Pro, inseriu-se a molécula do policetídeo 1 dentro do sitio vazio e novamente minimizou-se a estrutura por cálculos de MM (MMFF). Os mesmos procedimentos até a realização da otimização no método semi-empírico PM3 foram realizados, gerando-se o complexo AChE-policetídeo 1.

Os mesmos procedimentos para a criação do complexo AChE-policetídeo 1 foram utilizados na criação dos complexos acetilcolinaesterase com os policetídeos 2 e 3. De posse das estruturas dos complexos formados, os mesmos foram utilizados para gerar complexos onde o átomo de hidrogênio da hidroxila da Ser200 transferia-se para o Nε da His440, deixando o sitio protonado, denominado sitio 2.

Para isso foram realizados cálculos aproximando-se o átomo de hidrogênio da hidroxila da Ser200 do átomo de Nε da His440 deixando-o protonado, gerando-se complexos AChE-policetídeo agora com o sitio protonado (**Figuras 14, 15 e 16**). Este último passo foi possível com a utilização de outras novas palavras-chaves na linha de comando do MOPAC:

```
PM3 GRAD NOINTER NOLOG EF MMOK CHARGE=n T=n STEP= POINT=
```

STEP = o tamanho do passo para o caminho da reação

POINT = o número de pontos no caminho de reação

que permite um estudo sistemático do aumento da distância entre o oxigênio e o hidrogênio da Ser200 com conseqüente ruptura da ligação, e transferência do hidrogênio ao Nε da His440. Para a obtenção do sitio vazio protonado (sitio 2) utilizou-se o mesmo procedimento realizado para a formação dos complexos protonados, ou seja, transferiu-se o átomo de hidrogênio da hidroxila da Ser200 para o átomo de Nε da His440 .

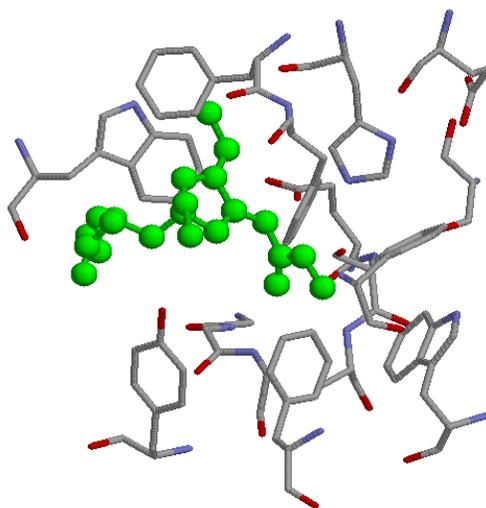


Figura 14: Estrutura otimizada do policetídeo 1 no sitio 2 da AChE

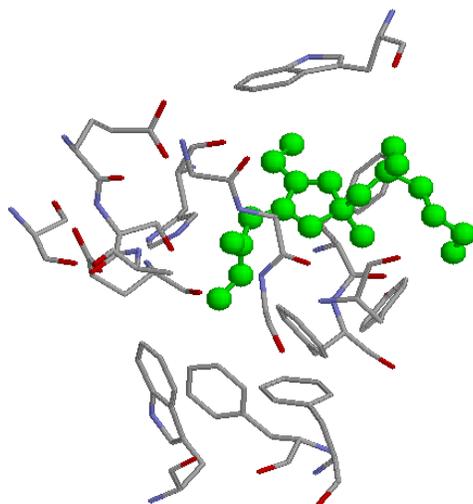


Figura 15: Estrutura otimizada do policetídeo 2 no sitio 2 da AChE

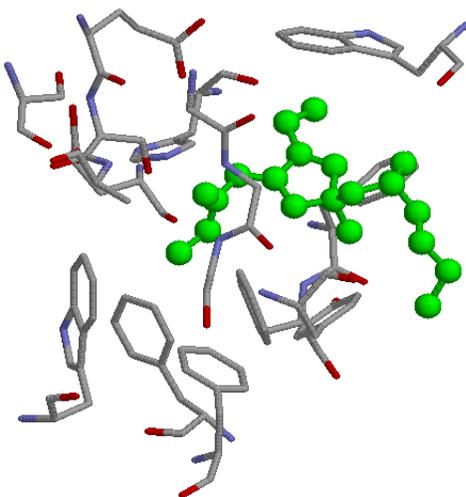


Figura 16: Estrutura otimizada do policetídeo 3 no sitio 2 da AChE

A fim de se fazer uma comparação também foram realizados cálculos com a estrutura da acetilcolina não-ligada dentro dos sítios 1 e 2, além da sua estrutura ligada ao átomo de $O\gamma$ da Ser200, que seriam as três primeiras etapas da hidrólise da acetilcolina (**Figura 17**). Esses cálculos serviriam para testar a confiabilidade do método utilizado.

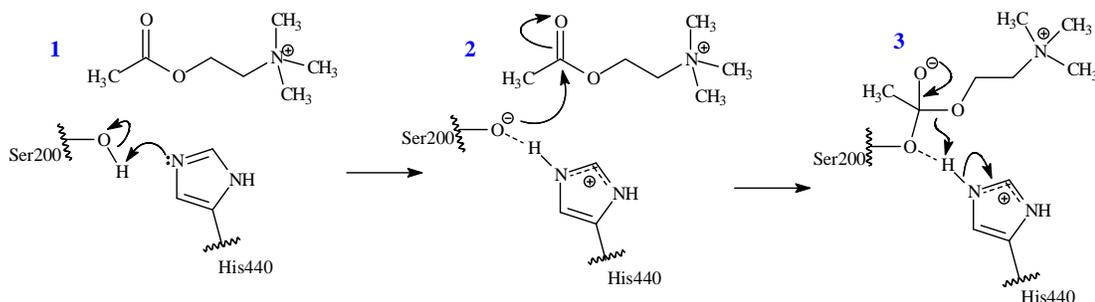


Figura 17: Os três primeiros passos do mecanismo de hidrólise da ACh pelos resíduos Ser200 e His440 da AChE.

Foi utilizada a mesma estrutura cristalizada de código 1AMN. A primeira etapa seria com o sítio 1 simulando a entrada da acetilcolina no sítio ativo da enzima, a segunda etapa seria, a transferência do átomo de hidrogênio da Ser200 para o átomo de N ϵ da His440 (sítio 2), tornando a Ser200 um melhor nucleófilo e por último a acetilcolina ligada formando o intermediário tetraédrico da reação.

A acetilcolina foi construída no programa PC Spartan Pro a partir da estrutura do inibidor TMTFA. O primeiro arquivo gerado foi com a acetilcolina ligada covalentemente a Ser200.

O arquivo gerado já otimizado foi utilizado para criar o arquivo acetilcolina não-ligada no sítio 2. Isso foi possível novamente utilizando-se as duas palavras chaves “Step” e “Point”. Essas palavras chaves aumentam a distância na ligação entre o oxigênio da cadeia lateral da Ser200 e o carbono carbonílico até o momento em que esta ligação é rompida gerando então a acetilcolina não-ligada no sítio 2, pois o átomo de hidrogênio da Ser200 continua ligado ao átomo de N ϵ da His440.

O último arquivo criado, a acetilcolina não-ligada no sítio 1, foi gerado a partir do arquivo acetilcolina não-ligada no sítio 2, já com a geometria otimizada. A mesma linha de comando acima foi utilizada só que agora a distância aumentada foi entre o átomo de nitrogênio da His440 ligada ao hidrogênio proveniente da Ser200. Com a distância aumentada o átomo de hidrogênio retornaria à Ser200, seu aminoácido de origem.

Também foram investigados os valores de energia de interação de dois inibidores já conhecidos, para fins de comparação. A tacrina (**Figura 11**, nº 01), o primeiro fármaco utilizado para o MA, e a huprina X (**Figura 11**, nº 07), um poderoso inibidor da AChE.

Para esse estudo, o modelo enzimático utilizado como referência foi construído a partir da estrutura cristalográfica da enzima de *Torpedo californica* com o inibidor tacrina, de código 1ACJ no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB)(**Figura 18**).

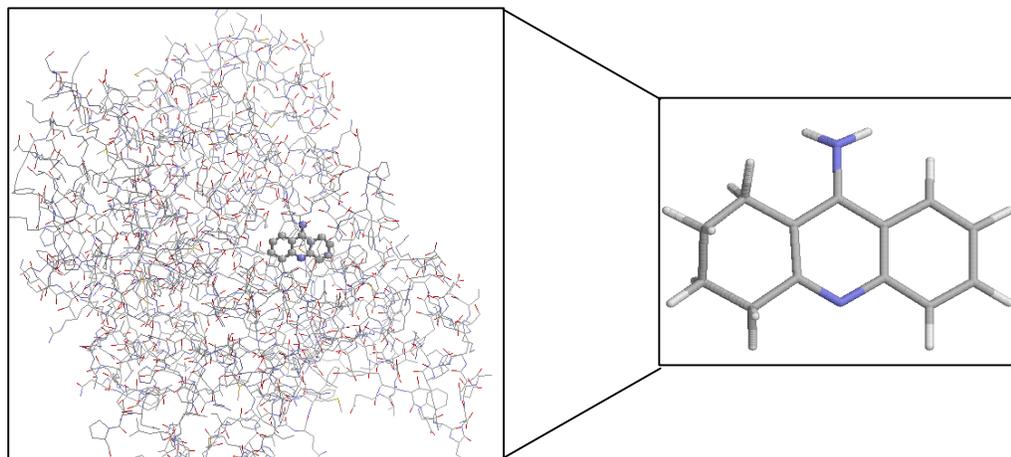


Figura 18: Enzima AChE de código 1ACJ com o inibidor tacrina

Foram considerados no modelo do sítio ativo desta enzima aqueles aminoácidos com pelo menos um átomo em um raio de 4,7Å do inibidor, através do programa RasMol 2.7.2.1.1. Moléculas de água também foram consideradas, baseando-se em sua proximidade com os aminoácidos selecionados. O modelo final foi composto pelas coordenadas cartesianas para os aminoácidos Glu199, Asp72, Phe330, Trp84, Trp432, Ser81, Ser200, His440, Tyr130, Tyr334, Tyr442, Gly80, Gly117, Gly118, Gly441 e Ile439 além de seis moléculas de água (604, 607, 609, 616, 634 e 643). Neste arquivo, como os átomos de hidrogênio dos aminoácidos não estavam presentes, precisou-se adicioná-los através do programa Babel 1.6 com o comando:

```
babel -ipdb [nome do arquivo].pdb -h -omopint [nome do arquivo].mop
```

Editando-se o arquivo no programa Spartan Pro, acrescentou-se os átomos de hidrogênio das moléculas de água e verificou-se todos os átomos da estrutura para se acertar possíveis erros de protonação. O mesmo procedimento de otimização anterior foi adotado aqui.

A estrutura da huprina X foi criada a partir da estrutura da tacrina já otimizada e o sítio vazio foi criado utilizando-se esta mesma estrutura, e apenas eliminando-se o inibidor. Ambas

as modificações foram realizadas no programa Spartan Pro e logo após seguiu-se os mesmos procedimentos utilizados até aqui.

Como provavelmente no meio biológico os átomos de N da tacrina e huprina X encontram-se protonados, também foram realizados cálculos com átomos de N heterocíclico dos inibidores tacrina e huprina X protonados. A otimização de toda a estrutura, com os inibidores tacrina e huprina X, foi realizada em ambos os sítios com o programa MOPAC6.0.

4 - RESULTADOS e DISCUSSÃO

No início deste trabalho foram feitos cálculos das três primeiras etapas da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinaesterase de *Torpedo californica* (TcAChE) (**Figura 17**) e estes foram comparados com os dados da literatura (SANT'ANNA *et al.*, 2006) a fim de validar o método utilizado. Seguem na **Tabela 3** os valores calculados descritos acima:

Tabela 3: Valores relativos de entalpia de formação das etapas 1, 2 e 3 (**Figura 17**) da hidrólise da ACh pela TcAChE calculados pelo método semi-empírico:

$\Delta H_{f,298k}^{\circ}$ (kcal/mol)	1	2	3
Presente trabalho	0,00	32,69	13,06
Sant'Anna <i>et al.</i> , 2006	0,00	35,50	13,00

A estrutura cristalográfica da acetilcolinaesterase de *Drosophila melanogaster* (DmAChE) revelou diferenças estruturais após comparação com a TcAChE (SANT'ANNA *et al.*, 2006), isto está de acordo com o que já foi dito sobre o poliformismo desta enzima (TÕUGU, 2001).

Os valores encontrados neste trabalho estão em concordância com a literatura e sua pequena diferença energética pode estar relacionada com o fato de ambos os trabalhos terem sido realizados em acetilcolinaesterase de espécies distintas e por isso possuírem alguns resíduos de aminoácidos diferentes.

Deve-se ressaltar que a hidrólise da acetilcolina não acaba na terceira etapa e que o valor de entalpia positivo encontrado até aqui não condiz com a eficiência da enzima e que até o fim da hidrólise da acetilcolina este valor encontra-se totalmente favorável ao processo, como pode ser acompanhado pelos dados da literatura (SANT'ANNA *et al.*, 2006).

Após a validação do método o mesmo foi utilizado para analisar as principais interações formadas pelo complexo AChE-policetídeo1 no sitio ativo 2 como mostra a **Figura 19** e no sitio ativo 1 e também foi feita uma comparação dos mesmos complexos em ambos os sitios através dos respectivos valores de entalpia de formação. Estes valores foram obtidos a partir da diferença entre o valor de entalpia do complexo AChE-Policetídeo1 e a soma dos respectivos valores para o policetídeo isolado e o sitio vazio como segue reportado na **Tabela 4**, pois não existe clareza no estado em que o sitio se encontra (protonado ou desprotonado) quando interage com a substância estudada.

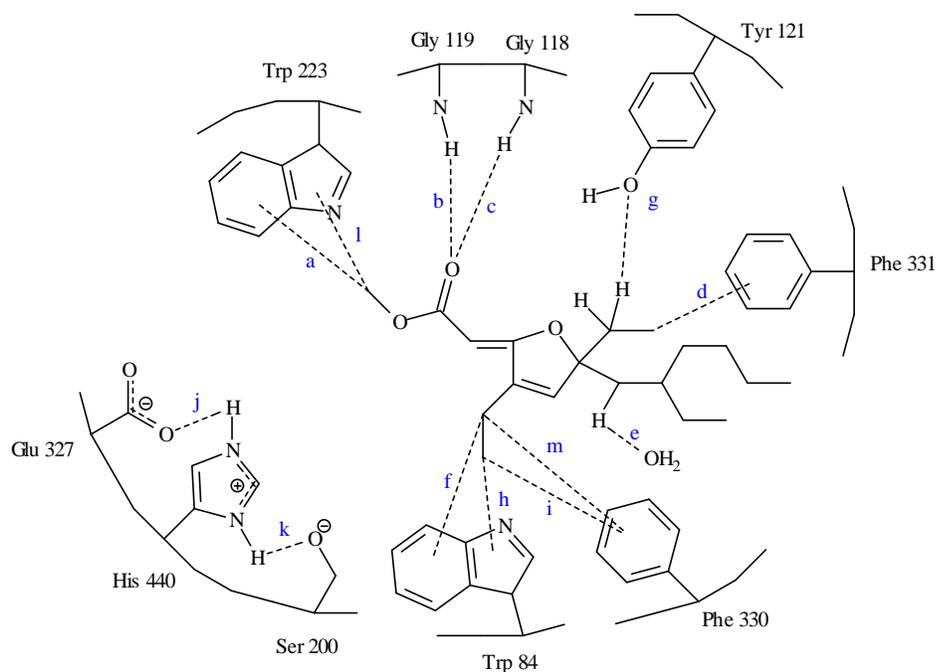


Figura 19: Principais interações estabelecidas entre o policetídeo 1 no sitio 2

Tabela 4: Valores de entalpia ($\Delta H^{\circ}_{298} = \Delta H^{\circ}_{298}(\text{Pol1} + \text{AChE}) - [\Delta H^{\circ}_{298}(\text{AChE}) + \Delta H^{\circ}_{298}(\text{Pol1})]$), e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE à molécula de policetídeo 1 em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.

Propriedade ^a	AChE-Pol 1 Sítio 1	AChE-Pol 1 Sítio 2
a	3,92	3,90
b	1,79 (126,05°)	1,79 (148,23°)
c	2,37 (126,05°)	2,29 (128,21°)
d	4,46	4,32
e	1,81	1,83
f	3,95	3,82
g	2,54	2,54
h	4,11	3,97
i	4,27	4,32
j	1,73 (162,89°)	1,71 (163,31°)
k	1,79 (171,23°)	1,59 (153,74°)
l	5,04	5,06
m	5,13	5,25
ΔH°_{298} ^b	- 16,63	- 16,84

^a Distâncias em Å; números entre parênteses representam os ângulos das ligações.

^b kcal/mol.

Observou-se uma variação muito pequena dos valores de entalpia de formação para o policetídeo 1 em ambos os sítios. Os dados geométricos de ambos os sítios também pouco diferem entre si, respondendo portanto pela semelhança entre os dados energéticos.

As diferenças entre os valores geométricos mais significativas nesta comparação foram encontradas para as distâncias d (0,14Å), f (0,13Å), h (0,14Å), m (0,12 Å), e k (0,21Å) sendo que esta última nada tem a ver com a interação estabelecidas entre o sítio ativo e o policetídeo 1, mas sim com o estado em que o sítio se encontra (protonado ou não). Pode-se, aliás, perceber que há uma maior interação entre a His440 protonada e a Ser200, evidenciado por uma menor distância entre estes resíduos (distância k), quando o primeiro aminoácido encontra-se protonado (sítio 2).

A sobreposição dos complexos AChE-Policetídeo 1 no sítio 1 e no sítio 2 (**Figura 20**) reafirma o que foi observado anteriormente: o deslocamento da posição dos resíduos de

aminoácidos foram insignificantes de um sitio para outro, fornecendo assim uma variação mínima em seus valores de entalpia.

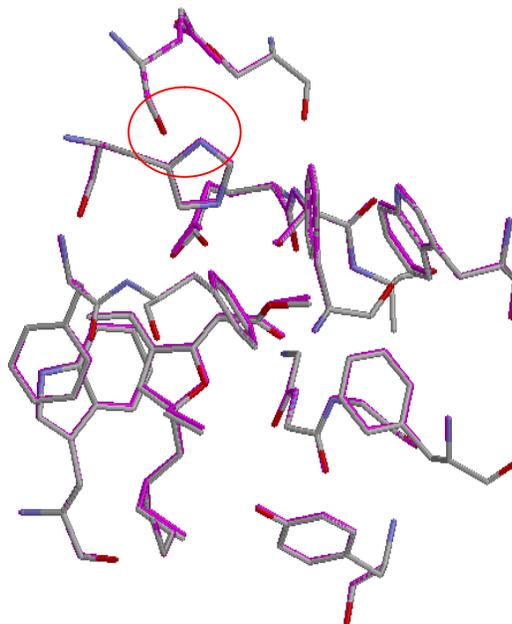


Figura 20: Representação da sobreposição dos complexos AChE-Policetídeo 1 no sitio 1 e 2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sitio 1. A região de diferença entre os sitios da AChE que encontram-se protonados (sitio 2) ou não (sitio 1) é evidenciada no círculo vermelho.

Também foi realizada uma comparação da sobreposição do complexo AChE-Policetídeo 1 no sitio 1 sobre o sitio vazio 1 (**Figura 21**). Observa-se um afastamento mais pronunciado dos resíduos dos aminoácidos Phe 331 e Tyr 121 após a introdução do inibidor.

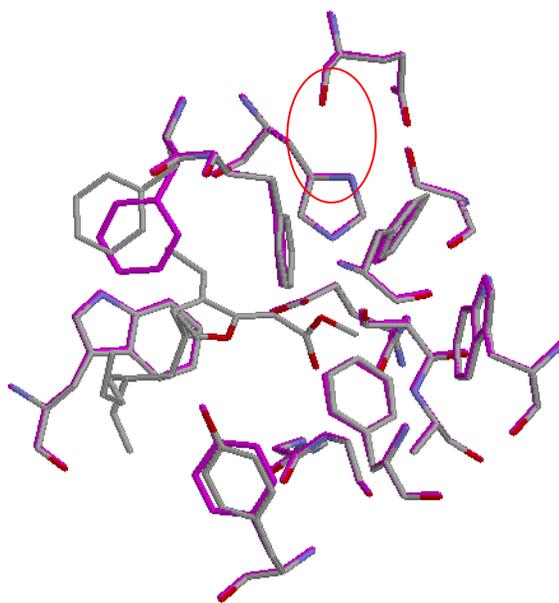


Figura 21: Representação da sobreposição do complexo AChE-Policetídeo 1 no sítio 1 sobre o sítio vazio neutro. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sítio vazio. A região de diferença entre os sítios da AChE que encontram-se protonados (sítio 2) ou não (sítio 1) é evidenciada no círculo vermelho.

O mesmo procedimento foi repetido para os outros dois policetídeos. Seguem abaixo as principais distâncias entre fragmentos do complexo AChE-policetídeo 2 no sítio 2 (**Figura 22**) e os valores de entalpia de formação para o policetídeo 2 em ambos os sítios, juntamente com os valores das distâncias das interações geométricas dentro de cada sítio (**Tabela 5**).

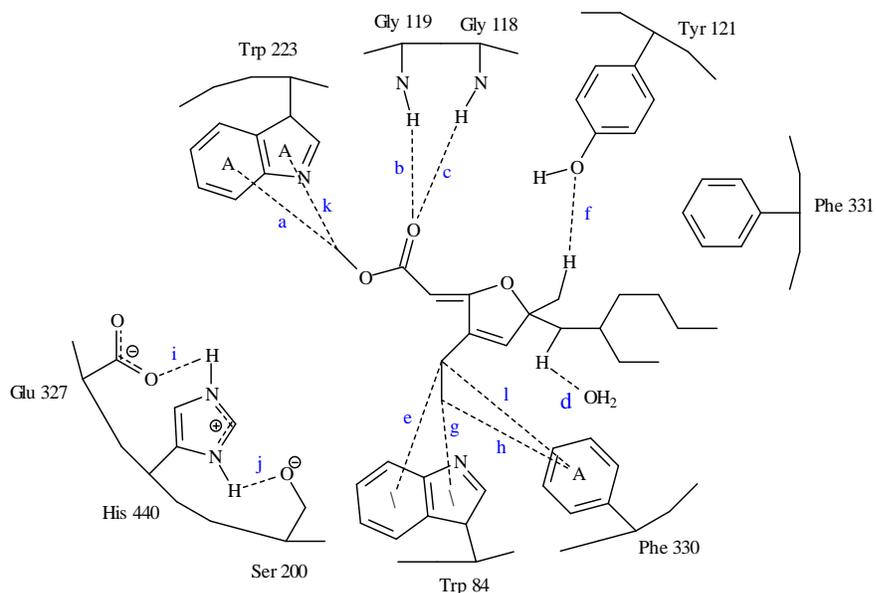


Figura 22: Principais interações estabelecidas entre o policetideo 2 no sitio 2

Tabela 5: Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE à molécula de policetideo 2 em ambos os sitios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.

Propriedade ^a	AChE-Pol 2 Sitio 1	AChE-Pol 2 Sitio 2
a	3,98	3,90
b	1,79 (147,61°)	1,79 (144,32°)
c	1,90 (137,28°)	2,36 (122,78°)
d	1,82 (116,54°)	1,82 (119,72°)
e	4,04	4,17
f	2,46	2,65
g	4,20	4,08
h	3,96	4,27
i	1,73 (162,53°)	1,71 (164,44°)
j	1,79 (170,17°)	1,59 (152,99°)
k	5,21	5,10
l	4,96	5,19
ΔH_{298}° ^b	- 13,33	- 16,30

^a Distâncias em Å; números entre parênteses representam os ângulos das ligações.

^b kcal/mol.

Quando comparamos o calor de formação do policetídeo 2 em ambos os sítios observa-se uma variação maior do que a mesma encontrada para o policetídeo 1, isso talvez se dê por que a diferença entre as distâncias do policetídeo aos resíduos de TcAChE com a substância estudada em ambos os sítios, é bem maior para o policetídeo 2 do que no caso do policetídeo 1. No policetídeo 1 é observada também uma interação a mais do que para o policetídeo 2, já que o mesmo possui um grupamento etil que interage com o resíduo Phe331.

Na sobreposição do policetídeo 2 em ambos os sítios podemos observar uma pequena mudança nos resíduos da Tyr121, Phe330 e na parte éster do policetídeo 2 (**Figura 23**).

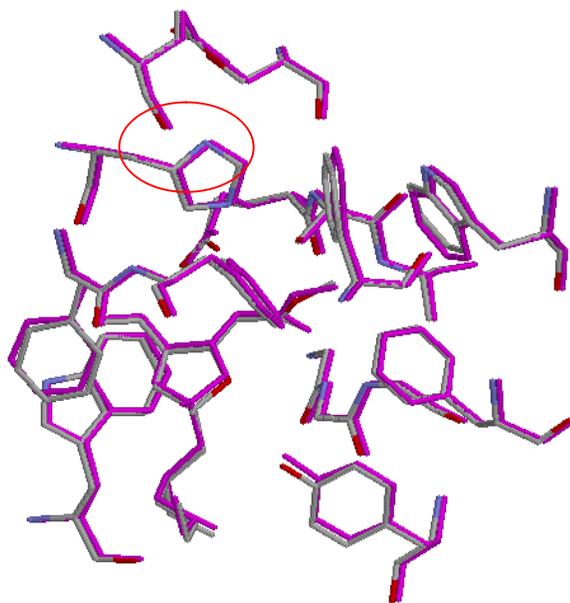


Figura 23: Representação da sobreposição dos complexos AChE-Policetídeo 2 no sítio 1 e 2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sítio 1. A região de diferença entre os sítios da AChE que encontram-se protonados (sítio 2) ou não (sítio 1) é evidenciada no círculo vermelho.

Na comparação do complexo AChE-Policetídeo 2 sobre o sítio vazio (**Figura 24**) observa-se um afastamento mais pronunciado dos resíduos Phe 331 e Try 121 com a entrada do inibidor.

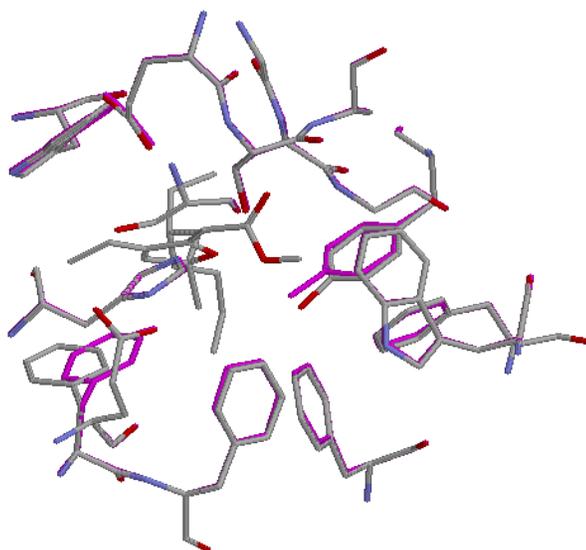


Figura 24: Representação da sobreposição do complexo AChE-Polícetídeo 2 no sitio 1 sobre o sitio vazio. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sitio vazio.

Na **Tabela 6** seguem abaixo os valores da distância das interações (como visto na **Figura 25**) e os valores de entalpia de formação para o polícetídeo 3.

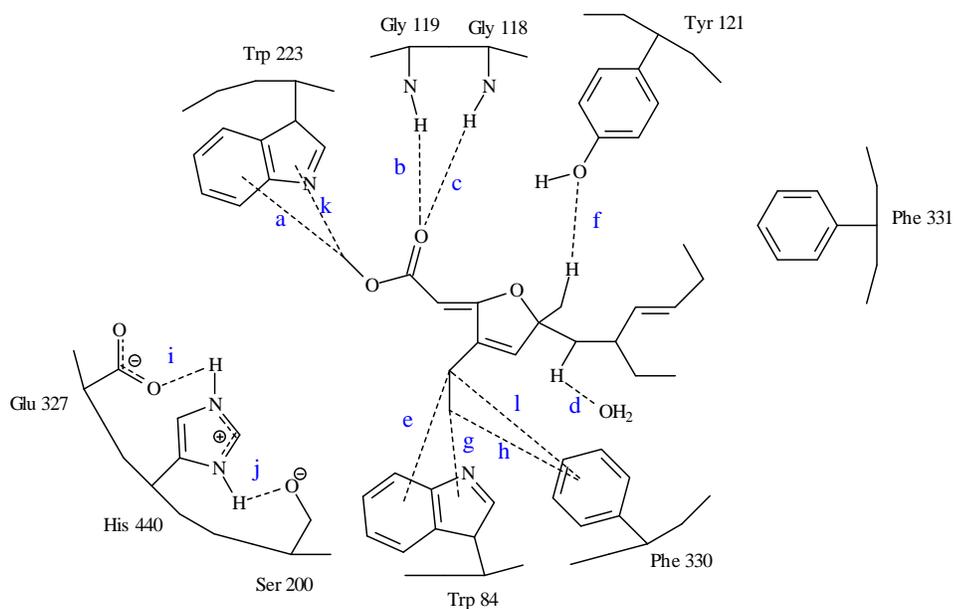


Figura 25: Principais interações formadas entre o polícetídeo 3 no sitio 2

Tabela 6: Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE à molécula de policetídeo 3 em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.

Propriedade ^a	AChE-Pol 3 Sítio 1	AChE-Pol 3 Sítio 2
a	3,83	3,88
b	1,77 (147.64°)	1,78 (145.53°)
c	1,95 (139.66°)	2,35 (124.78°)
d	1,82 (117.27°)	1,82 (118.03°)
e	4,01	3,84
f	2,45	2,74
g	4,14	4,08
h	4,10	4,27
i	1,73 (162.38°)	1,70 (163.97°)
j	1,79 (170.46°)	1,59 (153.19°)
k	5,07	5,05
l	5,11	5,21
ΔH_{298}° ^b	- 16,08	- 17,40

^a Distâncias em Å; números entre parênteses representam os ângulos das ligações.

^b kcal/mol.

Quando comparamos os valores energéticos do policetídeo 3 em ambos os sítios observamos que a diferença entre eles não é tão grande como para o policetídeo 2, assim também como as distâncias entre os resíduos e o policetídeo, sendo um pouco maior quando comparados com aqueles do policetídeo 1.

Observou-se em todos os casos que os valores de entalpia de formação mais favoráveis sempre se encontravam nos complexos com o sítio protonado, o que nos leva a imaginar se este fato não estaria contribuindo para favorecer a interação entre o policetídeo e o sítio.

Na sobreposição referente ao complexo AChE-Policetídeo 3 no sítio 1 e 2 (**Figura 26**) observamos uma pequena mudança de posição em alguns resíduos de aminoácidos como o resíduo Tyr121, Phe288 e a parte éster do policetídeo 3, observado também para o policetídeo 2, sendo que neste caso a alteração é menor.

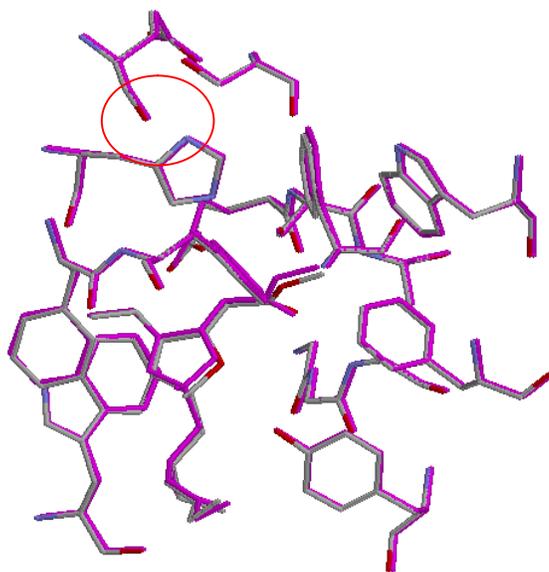


Figura 26: Representação da sobreposição dos complexos AChE-Policetídeo 3 no sitio 1 e 2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sitio 1. A região de diferença entre os sitios da AChE que encontram-se protonados (sitio 2) ou não (sitio 1) é evidenciada no círculo vermelho.

Nesta última sobreposição da AChE-policetídeo 3 sobre o sitio vazio, os afastamentos mais pronunciados foram os mesmos observados para os complexos anteriores: os resíduos Phe 331 e Tyr 121 como podemos observar na **Figura 27**. Esse afastamento provavelmente se deu por conta da cadeia lateral do policetídeos; com isso encerram-se as análises feitas para a substância estudada.

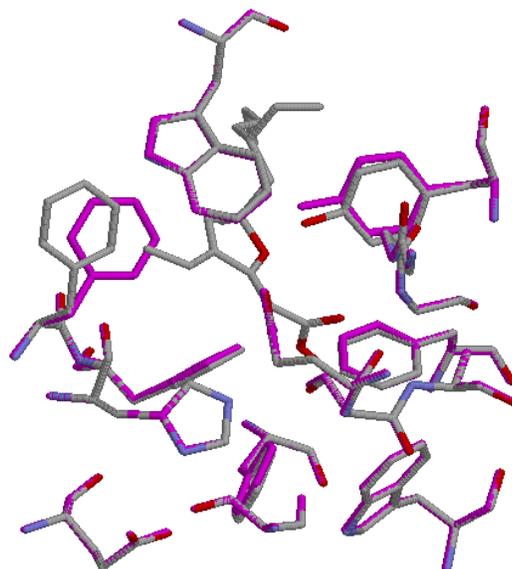


Figura 27: Representação da sobreposição do complexos AChE-Policetideo 3 no sitio 1 e sobre o sitio vazio. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. A cor lilás refere-se ao sitio vazio.

Abaixo seguem os resultados encontrados para a tacrina que é um fármaco para o MA e foi utilizado como referência na comparação da eficiência da inibição da acetilcolinaesterase.

Para os cálculos da tacrina também foram construídos os sitios 1 e 2 como explicado anteriormente, além da tacrina neutra, e com o átomo de N heterocíclico protonado em ambos os sitios uma vez que não se sabe qual estrutura ocorre dentro do sitio.

Verificou-se após a otimização de geometria que a tacrina manteve as mesmas interações com o sitio ativo que são observados na estrutura cristalográfica, entre elas o emparelhamento da tacrina com os resíduos de aminoácidos Trp84 e Phe330, a ligação hidrogênio do átomo de nitrogênio heterocíclico, com o átomo de oxigênio carbonílico da cadeia principal da His 440, para as estruturas que encontram-se protonadas, e a ligação hidrogênio do átomo de nitrogênio amino com uma molécula de água (BARRIL *et al.*, 2001)

Na **Tabela 7** abaixo exibida encontram-se listadas as distâncias entre a molécula de tacrina e o sitio ativo da AChE ambos neutros, assim como os valores de entalpia formação. As interações podem ser acompanhadas pela **Figura 28** que mostra interações estabelecidas entre a tacrina protonada e o sitio ativo protonado eliminando-se apenas a distância c, pois esta se refere à tacrina neutra (forma que impossibilita esta interação).

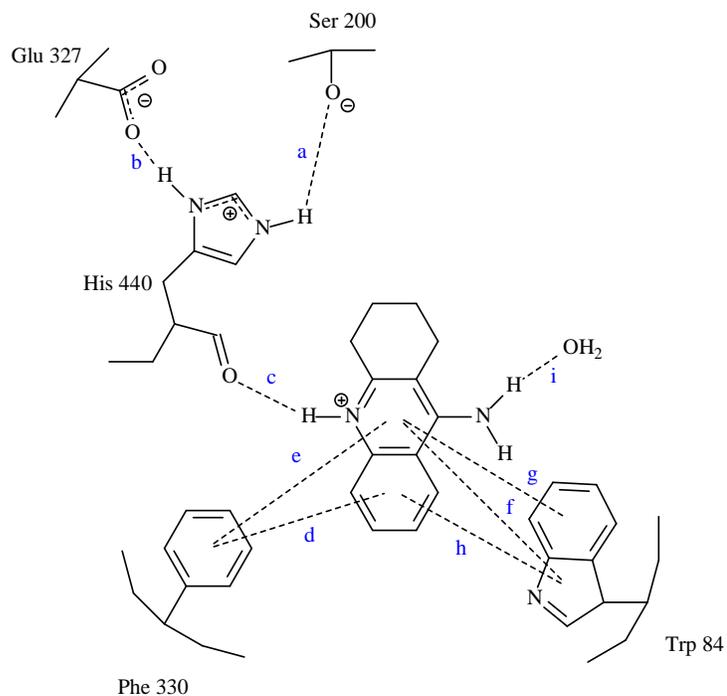


Figura 28: Tacrina protonada no sitio ativo da AChE protonado (sítio 2).

Tabela 7: Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE (1ACJ do PBD) à tacrina neutra em ambos os sítios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.

Propriedade ^a	THA N Sítio 1	THA N Sítio 2
a	2,90 (149,49°)	1,60 (150,97°)
b	1,80 (152,83°)	1,79 (136,18°)
c	-	-
d	4,13	4,28
e	4,74	4,74
f	3,90	4,18
g	4,73	4,99
h	4,82	5,02
i	2,50 (124,43°)	2,47 (124,38°)
ΔH°_{298} ^b	- 0,28	+ 5,01

^a Distâncias em Å; números entre parênteses representam os ângulos das ligações.

^b kcal/mol.

Os valores geométricos nesta comparação mostraram que a tacrina interage melhor quando o sitio encontra-se neutro, isso é ratificado pelos valores de entalpia dos mesmos. Lembrando que as distâncias a e b não se referem às interações da tacrina com o sitio e sim ao estado em que o sitio se encontra.

De acordo com a literatura, como foi citado anteriormente, existe uma ligação hidrogênio entre o átomo de nitrogênio heterocíclico com o átomo de oxigênio carbonílico da cadeia principal da His 440. Isto só seria possível caso este átomo de nitrogênio estivesse protonado, por isso este estudo também foi realizado em ambos os sitios e provavelmente esta interação seria a responsável pelo aumento significativo nos valores de entalpia encontrados, já que se observa uma melhora em todas as interações entre a tacrina e os sitios 1 e 2 quando a mesma encontra-se protonada. (**Tabela 8**).

Tabela 8: Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE (1ACJ do PBD) e a tacrina protonada em ambos os sitios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.

Propriedade ^a	THA P Sitio 1	THA P Sitio 2
a	3,12 (132,16°)	1,61 (165,27°)
b	1,79 (154,41°)	2,53 (98,01°)
c	1,88 (168,15°)	1,83 (168,11°)
d	4,12	4,28
e	4,50	4,66
f	4,09	4,10
g	4,67	4,50
h	4,80	4,82
i	1,80 (144,76°)	1,82 (143,76°)
ΔH_{298}° ^b	- 103,56	- 93,25

^a Distâncias em Å; números entre parênteses representam os ângulos das ligações.

^b kcal/mol.

O último estudo realizado neste trabalho foi aquele que trata da interação entre a Huprina X e o sitio da AChE, onde observou-se um aumento no número de interações que ocorrem entre o inibidor e o sitio ativo da enzima (**Figura 29**), quando comparado com a

tacrina. Neste último estudo houve um aumento de duas ligações hidrogênio entre o inibidor e o sitio ativo. Quando comparamos os valores de entalpia encontrados para a huprina X neutra e a tacrina neutra ambas no sitio 1 e 2 observa-se um aumento energético significativo, provavelmente pelo aumento no número de interações.

Quanto à huprina X neutra quando em um sitio e noutro (**Tabela 9**), novamente observa-se uma melhor interação quando ela se encontra no sitio neutro, com exceção da diferença na distância e (0,89Å), onde foi observada uma interação melhor no sitio protonado, já que a diferença da distância a (0,93Å) nada tem a ver com a interação inibidor-sitio ativo e sim com o estado em que o sitio se encontra (protonado ou não).

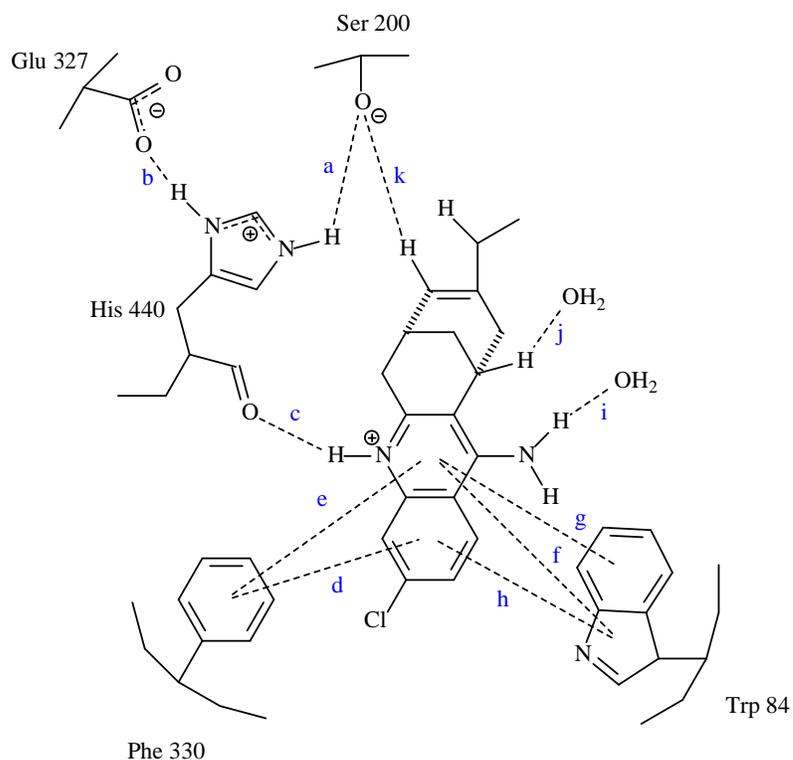


Figura 29: huprina X protonada no sitio ativo protonado (sitio 2).

Tabela 9: Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE (1ACJ do PBD) à huprina X neutra em ambos os sitios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.

Propriedade ^a	HUP N Sitio 1	HUP N Sitio 2
a	2,56 (157,03°)	1,63 (175,20°)
b	2,64 (113,95°)	3,20 (82,67°)
c	-	-
d	3,84	3,90
e	4,27	3,38
f	4,22	4,87
g	5,12	5,72
h	5,09	5,30
i	1,85 (135,09°)	2,53 (102,27°)
j	1,84 (120,67°)	1,86 (117,23°)
k	2,89	1,80
ΔH_{298}° ^b	- 17,67	- 10,93

^a Distâncias em Å; números entre parênteses representam os ângulos das ligações.

^b kcal/mol.

A huprina X também foi estudada tendo o seu átomo de nitrogênio heterocíclico protonado, já que assim como a tacrina o seu estado dentro do sitio era desconhecido.

Assim como observado para tacrina nas formas neutra e protonada, a huprina X neutra e protonada também tiveram um valor de entalpia de formação mais baixo quando se encontravam no sitio neutro (**Tabela 10**).

Observou-se que tanto nos cálculos realizados para a tacrina quanto para huprina X, os valores de entalpia foram mais significativos quando ambas se encontravam protonadas.

Tabela 10: Valores de entalpia e distâncias selecionadas de resíduos de aminoácidos da TcAChE (1ACJ do PBD) à huprina X neutra em ambos os sitios. Cálculos realizados pelo método semiempírico PM3.

Propriedade ^a	HUP P Sitio 1	HUP P Sitio 2
a	2,49 (142,19°)	1,63 (168,55°)
b	3,10 (85,66°)	3,23 (89,75°)
c	1,84 (166,73°)	1,98 (164,36°)
d	3,84	3,71
e	3,90	3,90
f	4,37	4,40
g	4,42	4,44
h	4,72	4,80
i	1,79 (128,63°)	1,78 (121,37°)
j	1,84 (122,47°)	1,85 (123,69°)
k	2,59	1,76
ΔH_{298}° ^b	- 127,05	- 115,18

^a Distâncias em Å; números entre parênteses representam os ângulos das ligações.

^b kcal/mol.

Para os valores geométricos encontrados entre a huprina X em ambos os sitio se observou uma interação mais efetiva no sitio 1, com exceção para a diferença a (0,86Å) que refere-se ao estado do sitio e a diferença k (0,86Å) que também tem a ver com o estado do sitio já que a ligação hidrogênio está sendo realizada com o átomo de oxigênio do aminoácido Ser200.

Nas análises realizadas observou-se que os valores energéticos dos policetídeos em comparação com os da tacrina e huprina X são opostos em relação ao estado do sitio, ou seja, os policetídeos demonstraram melhor afinidade quando o sitio encontrava-se protonado diferentemente da tacrina e huprina X, que obtiveram os melhores resultados quando interagiram com o sitio neutro.

Os valores de entalpia de formação encontrados para os complexos TcAChE-policetídeos demonstraram ser favoráveis, independentemente do estado do sitio, quando comparados com os valores energéticos da tacrina e huprina X quando ambas encontram-se

neutras, com exceção huprina X neutra no sitio neutro no qual o valor energético é ligeiramente melhor.

Se comparados os policetídeos, independente do estado em que o sitio se encontra, com a tacrina e huprina X protonadas em ambos os sitios seus valores energéticos são indiscutivelmente mais favoráveis, mas não se pode esquecer que os valores energéticos não são a único requisito para se analisar possíveis fármacos. Existem outros como, por exemplo, a toxicidade, que a tacrina já demonstrou possuir.

Adicionalmente, é importante ressaltar que os valores de entalpia de formação encontrados para os policetídeos podem sugerir um grau de reversibilidade na interação destes com a enzima, desejável muitas vezes nos fármacos.

CONCLUSÃO

A principio os valores encontrados para todos os policetídeos tanto no sitio 1 quanto no sitio 2 mostraram-se favoráveis à formação do complexo. Entretanto, observou-se uma melhor interação dos mesmos pelo sitio da enzima com os resíduos Ser200 e His440 ionizados com pode ser observado pelos valores de entalpia.

Entre os policetídeos estudados não existe uma diferença de entalpia de interação significativa, que sugira selecionar apenas um ou alguns para um estudo experimental. No entanto, o policetídeo que demonstrou melhor valor de entalpia foi o que possui na sua cadeia lateral uma dupla ligação. Provavelmente esta estrutura poderia se acomodar melhor dentro do sitio ativo, observado por uma menor distância de interação.

Os resíduos de aminoácidos Phe 331 e Try 121 foram os que mais se afastaram de suas posições originais (sitio vazio) praticamente para todos os complexos formados pelos policetídeos.

A otimização da tacrina no sitio ativo confirmou as interações já descritas pela literatura. A literatura também descreve uma ligação hidrogênio entre o átomo do nitrogênio heterocíclico com o átomo de oxigênio do carbono carbonílico da cadeia principal da His440 o que é confirmado pela grande diferença na entalpia encontrada para a tacrina quando a mesma se encontrava protonada ou não.

Os valores de entalpia para o híbrido da tacrina, a huprina X, também sugerem que para esta estrutura o átomo de nitrogênio heterocíclico também se encontra protonado.

Diferentemente dos policetídeos, os inibidores tacrina e huprina X forneceram valores de entalpia mais favoráveis no sítio ativo com os resíduos Ser200 e His440 neutros, independentemente do estado em que o inibidor se encontra (protonado ou não). Sendo que quando no seu estado protonado esses inibidores demonstram uma interação mais favorável.

Quando analisados os inibidores tacrina e huprina X independente do seu estado (protonado ou não) notamos que as interações π - π do anel da tacrina e huprina X são quase sempre mais favoráveis no sítio 1, o que nos faz concluir que esta interação possa ser a responsável pela grande diferença energética quando comparamos o inibidor no mesmo estado mais em sítios diferentes.

Os policetídeos quando comparados com o fármaco tacrina, e a huprina X que se encontra em estudos mais avançados, demonstram não serem competitivos, pelo menos energeticamente, mas como já foi dito anteriormente a tacrina possui toxicidade hepática muito alta e os inibidores estudados por serem substâncias naturais poderiam neste caso serem competitivos se demonstrassem baixa toxicidade.

Foram utilizados neste trabalho, $\Delta H_f^{\circ}_{298,15k}$ e distâncias de interação enzima-substrato, como critérios para a investigação da inibição dos policetídeos. Entretanto, baseando-nos na literatura, outras orientações no sítio podem ser investigadas, ou mesmo interações dos policetídeos em sítios alostéricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABREU, IZABELLA D. de; FORLENZA, ORESTES, V.; BARROS, HÉLIO LAUAR DE; Demência de Alzheimer: correlação entre memória e autonomia; **Revista de Psiquiatria Clínica**; v.32(3); 131-136; 2005.

ALMEIDA, O. P.; Tratamento da Doença de Alzheimer Avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos; **Arquivos de Neuropsiquiatria**; v.56(3-B); 688-696; 1998.

ANDRADE, MARCELO T.; LIMA, JOSÉLIA A.; PINTO, ÂNGELO C.; RESENDE, CLAUDIA, M.; CARVALHO, MERIANE P.; EPIFANIO, ROSANGÉLA A.; Índole alkaloids *Tabernaemontana australis* (Muell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme; **Bioorganic & Medicinal Chemistry**; v.13; 4092-4095; 2005.

BARRIL, X.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J.; Towards improved acetylcholinesterase inhibitors: A structural and computational approach; **Medicinal Chemistry**; v.1; 255-266; 2001.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PADISO, M. A.; Neurociências: desvendando o sistema nervoso; coord. Trad. Jorge Alberto Quillfeldt; 2ª edição; Porto Alegre: Artmed; 2002.

BELEDO, J. F.; Terapéutica farmacológica de las demencias; **Medicine**; v.7(99); 4633-4643; 1998.

BIRKS, R.; MACINTOSH, F. C.; Acetylcholine Metabolism of A Sympathetic Ganglion; **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**; v.39; 787; 1961.

BLOKLAND, A.; Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory?; **Brain Research Reviews**; v.21; 285-300; 1996.

BOTTI, S. A.; FELDER, C. E.; LIFSON, S.; SUSSMAN, J. L.; SILMAN, I.; A Modular Treatment of Molecular Traffic Through the Active Site of Cholinesterase; **Biophysical Journal**; v.777; 2430-2450; 1999.

CACABELOS, R.; Enfermedade de Alzheimer Presente Terapéutico y Retos Futuros, v.XXX; n°04; 2001.

CARVALHO, M. P.; MATOS, F., O. P.; EPIFANIO, R. A.; Novos agentes anticolinesterásicos a partir de invertebrados marinhos; IX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química; IME (RJ); 2003.

CARVALHO, M. P.; MATOS, D. D.; EPIFANIO, R. A.; Anticolinesterásicos de esponjas marinhas brasileiras, 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Águas de Lindóia (SP); 2006.

CASTRO, A. T.; Estudos por modelagem molecular da Reativação da Acetilcolinaesterase inibida por agentes químicos neurotóxicos; dissertação de mestrado; IME; 2002.

CASTRO, B. M.; Funções motoras em camundongos deficientes do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT); dissertação de mestrado; UFMG; 2006.

CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. M.; International union of pharmacology XVII Classification of muscarinic acetylcholine receptors; **Pharmacological Reviews**; v.50; nº2; 279-289; 1998.

CHAVES, M. B.; AVERSI-FERRERA, T. A.; Terapia Medicamentosa da Doença de Alzheimer; **Revista Eletrônica de Farmácia**; v.01; 1-7; 2008.

COSTA, A. F.; PICON, P. D.; AMARAL, K. M.; Protocolo de Diretrizes Terapêuticas Doença de Alzheimer; Portaria SAS/MS nº 843; 2002.

DARVESH, S.; HOPKINS, DA.; GEULA, C.; Neurobiology of butyrylcholinesterase; **Nature Reviews Neuroscience**; v.04; 131-138; 2003.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C.; Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age; **Life Sciences**; v.68; 1545-1555; 2001.

DOMINGUES, S. F.; Caracterização das Interações Protéicas envolvidas no tráfego celular do transportador de colina de alta afinidade- CHT1; Dissertação de mestrado; UFMG; 2006.

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C. e membros do Departamento de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia; Tratamento da Doença de Alzheimer; **Arquivos de Neuropsiquiatria**; v.63(4); 1104-1112; 2005.

EPIFANIO, R. A.; PINHEIRO, L. S.; ALVES, Natalia, C.; Polyketides from the Marine Sponge *Plakortis angulospiculatus*; **Journal of Brazilian Chemical Society**; v.16; nº 6B; 1367-1371; 2005.

FILHO, J. M. B.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M. B.; FILHO, PETRÔNIO F. A.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; JÚNIOR, L. J. Q.; Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase; **Brazilian Journal of Pharmacognosy**; v.16(2); 258-285; abr/jun 2006.

FORLENZA, O. V.; Tratamento Farmacológico da doença de Alzheimer, **Revista de Psiquiatria Clínica**; v.32(3); 137-148; 2005.

FRESH, A.; Structure and Mechanism in Protein; Science W. H. Freeman and Company; New York; 1999.

FUXREITER, M.; WARSHEL, A.; Origin of the Power of Acetylcholinesterase: Computer Simulation Studies; **Journal of the American Chemical Society**; v.120; 183-194; 1998.

GANDIA, L.; ROJO, J.; GONZÁLEZ-RUBIO, J. M.; TAPIA, L.; PASCUAL, R.; HERMANDEZ-GUIJO, J. M.; Dianas Terapêuticas colinérgicas em la enfermedad de Alzheimer; Madri; 2002.

GLABE, C.; Avoiding Collateral Damage in Alzheimer's disease treatment; **Biomedicine**; v.314; 602-603; 2006.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.; A Century of Alzheimer Disease; **Science**; v.314; 777-779; 2006.

GOLD, P. E.; Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory; **Neurobiology of learning and Memory**; v.80; 194-210; 2003.

GOMES, A. M.; KOSZUOSKI, R.; Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular; **Revista Brasileira de Psiquiatria RS**; v.27(2); 197-205; 2005.

HOFFMAN, B. B.; TAYLOR, P.; Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill; New York; 2001.

HOSEA, N. A.; BERMAN, H. A.; TAYLOR, P.; Specificity and Orientation of trigonal Carboxyl Esters and tetrahedral Alkylphosphonyl Esters in Cholinesterase; **Biochemistry**; v.34; 11528-11536; 1995.

INOUE, K.; OLIVEIRA, G. H.; Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para doença de Alzheimer; **Infarma**; v.15; 11-12; 2003.

JENSEN, F.; Introduction to Computational Chemistry; Editora John Wiley & Sons; 1999.

JOSÉ, A. S.; Atividade da Acetilcolinesterase e da Porfobilinogênio – Síntese e alteração comportamental de ratos expostos à nicotina; dissertação de mestrado; UFMG; 2007.

JÚNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer; **Química Nova**; v.27; nº 04; 655-660; 2004.

KOELLNER, G.; KRYGER, G.; MILLARD, C. B.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L.; STEINER, T.; Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*; **Journal of Molecular Biology**; v.296(2); 713-735; 2000.

KOSSUGA, M. H.; NASCIMENTO, A. M.; PESSOA, C. Ó.; TEMPONE, A.; HADJU, E.; BERLINCK, R. G. S.; Avaliação biológica de compostos isolados da esponja *Plakortis angulospiculatus*; 30ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química; Águas de Lindóia (SP); 2007.

LEHNINGER, A. L.; Princípios de Bioquímica; 4ª edição; SP: Sarvier, 2006.

MARCO, J. L.; Inibidores clásicos y nuevos inibidores de la acetilcolinesterasa para tratar la enfermedad de Alzheimer; Madri; 2002.

MISGELD *et al.*; Roles of neurotransmitter in synapse formation: Development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase; **Neuron**; v.36; 635-648; 2002.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K.; Métodos de Química teórica e Modelagem Molecular; SP: Editora Livraria da Física; 1ª edição; 2007.

NAGUIB, M.; FLOOD, P.; McARDLE, J. J.; BRENNER, H. R.; Advances in Neurobiology of the Neuromuscular Junction – Implications for the Anesthesiologist; **Anesthesiology**; v.96; 202-231; 2002.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W.; α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing; **Current Opinion in Structural Biology**; v.09 (6); 732-737; 1999.

OBREGON, A. D. C.; 3-alcoxi-4-hidroxi pirrolidin-2-onas, 2-metilsulfanil pirimidina, enoil-carbamatos e 3-dialcoxifosforiloxi trialometilados: síntese e potencial inibitório sobre a atividade da enzima acetilcolinaesterase; Tese de doutorado; Santa Maria; 2006.

OLIVEIRA, D. L. C.; Ciclo de Vesícula Sináptica com conteúdo reduzido em junção neuromuscular; dissertação de mestrado; UFMG; 2007.

ORDENTHICH, A.; BARAK, D.; KRONMAN, C.; ARIEL, N.; SEGALL, Y.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A.; Functional Characteristics of the oxyanion hole in human acetylcholinesterase; **Journal Biological Chemistry**; v.273(31); 19509-19517; 1998.

PARSONS, S. M.; Transport Mechanisms in Acetylcholine and monoamine storage; **Faseb Journal**; v.14; 2423-2434; 2000.

PASTRE, R.; M. R., ANDREY-FILHO, E. R.; Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*; **Química Nova**; v.30; nº 08; 1867-1871; 2007.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; Prado, V. F.; MELLO, M. C.; GÓMEZ, M. V.; MELLO, F. G.; Regulation of acetylcholine syntesis and store; **Neurochemistry International**; v.41; 291-299; 2002.

PURVES, D. *et al.*; Neuroscience; second edition; Sinauer Associates; 2001.

ROBERSON, E. D.; MUCKE, L.; 100 Years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease; **Science**; v.314; 781; 2006

ROLE, L. W.; BERG, D. K.; Nicotinic Receptors in the development and molulation of CNS Synapses Neuron; **Neuron**; v.16(6); 1077-1085; 1996.

ROSENBERRY, T. L.; Adv. Enzymol. Relat. Áreas Mol Biol.; v.43; 103; 1975.

SANT'ANNA, C. M. R.; VIANA, A. S.; JÚNIOR, N. M. N.; A Semiempirical study of acetylcholine hydrolysis catalyzed by *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase; **Bioorganic Chemistry**; v.34; 77-89; 2006.

SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, Y.; NEWTON, M.; MACPHEE-QUIGLEY, K.; Primary Structure of *Torpedo californica* Acetylcholinesterase Deduced from cDNA sequences; **Nature**; v.319; 407-409; 1986.

SELWOOD, T.; FEASTER, S. R.; STATE, M. J.; PRYOR, A. N.; QUINN, D.; Parallel Mechanisms in Acetylcholinesterase – Catalyzed Hydrolysis of Choline Esters; **Journal American Chemical Society**; v.115; 10477-10482; 1993.

SEPČIĆ, K.; MARCEL, V.; KLAEBE, A.; TURK, T.; ŠUPUT, D.; FOURNIER, D.; Inhibition of acetylcholinesterase by alkyipyridinium polymer from the marine sponge, *Reniera sarai*; **Biochimica et Biophysica Acta**; v.1387; 217-225; 1998.

SEPČIĆ, K.; POKLAR, N.; VESNAVER, G.; FOURNIER, D.; TURK, T.; Maček, P.; Iteration of 3-Alkyipyridinium Polymers from the Sea Sponge *Reniera sarai* with Insect Acetylcholinesterase; **Journal of Protein Chemistry**; v.18; n° 3; 1999.

SIDELL, F. R.; Clinical Effects of Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors; **Journal Applied toxicology**; v.14(2); 111-113; 1994.

SILVA, D. C.; FEITOSA, C. M.; SANTOS, F. J. B.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; A importância da Análise fitoquímica na busca de novos inibidores da enzima acetilcolinaesterase (AChE) com plantas medicinais; I Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte de Educação Tecnológica, Natal (RN); 2006.

SILVA, G. R.; Estudo da Reativação da Acetilcolinaesterase inibida por organofosforados: análise conformacional da molécula de HI-6 e simulação da Reação de desfosforilação; dissertação de mestrado, IME, 2005.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S.; Acetylcholinesterase – new roles for an old actor; **Neuroscience**; v.02; 8; 2001.

STINE, K. E.; Brown, T. M.; Principles of Toxicology; **CRC Press**; 1996.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; PROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I.; Atomic Structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine – binding protein; **Science**; v.253; 872-879; 1991.

TAYLOR, P.; RADÍĆ, Z.; The cholinesterases: from genes to proteins; Annual Review **Pharmacology and Toxicology**; v.34; 281-320; 1994.

TORSELL, K. B. G.; Natural Product Chemistry: approach to secondary metabolism; Editora John Wiley & Sons; 1983.

TÕUGU, V.; Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition; **Current Medicinal Chemistry**; v.01; 155-170; 2001.

TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P., FEITOSA, C. M.; Atividades Larvicida e anticolinesterase de plantas do gênero *Kalanchoe*; **Química Nova**; v.29; n° 3; 415-418; 2006.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; Seleção de plantas com atividades anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer; **Química Nova**; v.26; n°3; 301-304; 2003

VIEIRA, T. S.; Estudos visando à síntese de novos derivados do LCC com potencial atividade no tratamento da doença de Alzheimer; dissertação de mestrado; UFB; 2007.

Disponível em: