

Natália Fernanda Frediani Pirolla

Modelagem molecular de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ para a doença de Alzheimer.

Dissertação de Mestrado realizada no Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM) e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química (IQ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

Araraquara
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

P671m Pirolla, Natália Fernanda Frediani
Modelagem molecular de ligantes de receptores
nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ para a doença de
Alzheimer / Natália Fernanda Frediani Pirolla. –
Araraquara : [s.n.], 2018
118 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Nailton Monteiro do Nascimento-Júnior

1. Doença de Alzheimer. 2. Receptores nicotínicos.
3. Estudos de validação. 4. Reconhecimento molecular.
5. Dinâmica molecular. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Modelagem Molecular de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ para a doença de Alzheimer"

AUTORA: NATÁLIA FERNANDA FREDIANI PIROLLA

ORIENTADOR: NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR

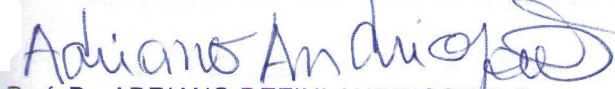
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. CLAUDIO VIEGAS JÚNIOR
Departamento de Química Medicinal / Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - Alfenas



Prof. Dr. ADRIANO DEFINI ANDRICOPULO
Departamento Físicas e Biomoleculares / Instituto de Física - USP - São Carlos

Araraquara, 28 de novembro de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Natália Fernanda Frediani Pirolla

Nome em citações bibliográficas: PIROLLA, N. F. F.

ENDEREÇO PROFISSIONAL: Avenida Prof. Francisco Degni, 55 – Jardim Quitandinha, Araraquara – SP, 14800-060

FORMAÇÃO ACADÊMICA/ TITULAÇÃO

Graduada em Licenciatura em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – *Campus Catanduva*.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Apresentações de trabalhos/palestras

- PIROLLA, N. F. F.; BATISTA, V.S.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Validation and analysis of bioactive compounds. 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ, **2018**, 21 a 24 de maio, Foz do Iguaçu, São Paulo, Brasil).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 46th World Chemistry Congress (IUPAC, **2017**, 7 a 13 de julho, São Paulo, Brasil);
- 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ, **2018**, 21 a 24 de maio, Foz do Iguaçu, São Paulo, Brasil).

DEDICATÓRIA

Primeiramente, agradeço a Deus por ter permitido e me confortado nas horas mais difíceis e sombrias, onde muitas vezes tive dúvidas se seria capaz de finalizar esse trabalho. Além disso, com a permissão Dele, foi possível encontrar tantas pessoas maravilhosas que me auxiliaram nesses dois anos de mestrado.

A seguir, agradeço à minha mãe, Eslaine Frediani e meu tio, Paulo César Frediani por serem meus pilares, exemplo de força e dedicação, onde o principal ensinamento foi ser sempre sincero e verdadeiro, primeiro comigo e com todos ao meu redor. Também tenho que agradecer ao meu companheiro Ivan Varini Soares, que aceitou caminhar ao meu lado, me dando suporte e apoio nas minhas ausências em função da dedicação que o curso de mestrado exige.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior pela orientação ao longo do mestrado, amizade, treinamento nas técnicas de modelagem molecular, discussões e ensinamentos relacionados à Química Medicinal e à superação de problemas e desafios enfrentados dentro da esfera científica, sempre me incentivando a ultrapassar meus limites e a desenvolver habilidades essenciais para minha vida profissional e contribuindo para o meu amadurecimento como cientista.

Ao Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca pela contribuição em relação às simulações de dinâmica molecular.

Aos amigos do Laboratório de Química Medicinal Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM) do IQ-CAR: Victor de Souza Batista e Thaís Rosa Ribeiro, que me acompanharam durante essa jornada e pelos momentos de descontração, apoio, companheirismo e agradável convivência.

Aos meus professores da Pós-Graduação, por todo conhecimento adquirido e aos componentes da banca por todas as contribuições dadas a este trabalho.

Aos órgãos de fomento: CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

***“Se vi mais longe, foi por
estar apoiado sobre ombros
de gigantes”***
(Isaac Newton)

RESUMO

FREDIANI PIROLLA, NATÁLIA F. Modelagem molecular de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ para a doença de Alzheimer. Araraquara, 2018. Dissertação de Mestrado em Química – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho), Araraquara, 2018.

Visando a obtenção de compostos inéditos com atividade agonista em receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ (nAChRs $\alpha 7$) para o tratamento da doença de Alzheimer, este trabalho foi iniciado a partir da estrutura cristalográfica do receptor $\alpha 7$ co-cristalizado com a lobelina, seguido de posterior validação do modelo *in silico* por redocagem e com ligantes da literatura com atividades *in vitro* conhecidas. Os ligantes foram construídos considerando o estado de protonação em pH fisiológico utilizando o programa Discovery Studio Visualizer e otimizados através do método semiempírico PM7 com o programa MOPAC 2016. A validação por redocagem do modelo do nAChR $\alpha 7$ foi baseada na análise de diferentes funções de pontuação (ChemPLP, ChemScore, GoldScore e ASP) para avaliar a orientação espacial dos ligantes (RMSD) e as interações ligante-receptor relevantes. Discovery Studio foi utilizado para analisar as interações previstas, as quais foram obtidas no programa GOLD e visualizadas no programa PyMol. De todas as funções de pontuação analisadas, a ASP forneceu os melhores resultados, apresentando pequenas variações de pontuação entre a pose com menor RMSD e a pose com melhor pontuação. Além disso, o modelo *in silico* foi capaz de prever corretamente as interações-chave entre os resíduos de aminoácidos com os quais a lobelina interage e das moléculas da literatura. Dessa forma, essa metodologia foi utilizada na triagem virtual dos 28 compostos planejados como ligantes do nAChR $\alpha 7$, em combinação com os resultados de ancoragem molecular dos compostos bioativos da literatura. Paralelamente, iniciaram-se estudos de dinâmica molecular com o intuito de otimizar a qualidade da estrutura 5AFN, que possui resolução de 2,15 Å. Os dados de pontuação e RMSD obtidos através da redocagem da lobelina foram maiores nos estudos com dinâmica molecular. Não foi possível observar similaridades estruturais entre as orientações espaciais dos ligantes com a lobelina. Um dos resíduo-chave do sítio ativo da lobelina, C186, está localizado em regiões não-permitidas (gráfico de Ramachandran). Ademais, a presença de solvente nos estudos com DM desnaturou a proteína. Logo, os estudos sem DM foram mais eficazes.

Palavras-chave: Atividade agonista. Lobelina. nAChRs $\alpha 7$. Doença de Alzheimer. Triagem virtual. Interações ligante-receptor. Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

FREDIANI PIROLLA, NATÁLIA F. Molecular modeling of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ligands for Alzheimer's disease. Araraquara, 2018. Dissertação de Mestrado em Química – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho), Araraquara, 2018.

Aiming to achieve novel compounds with agonist activity at $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7$ nAChRs) for the treatment of Alzheimer's disease, this work has started by using the crystallographic structure of $\alpha 7$ receptor co-crystallized with lobeline followed by validation of the in silico model with ligands from the literature with known in vitro activities. The ligands were constructed considering the protonation state at physiological pH using the Discovery Studio software and using the PM7 semiempiric method with MOPAC 2016. The validation for the nAChR $\alpha 7$ model was based on the analysis of several scoring functions (ChemPLP, ChemScore, GoldScore and ASP) for a spatial orientation of ligands (RMSD) and as relevant ligand-receptor interactions. Discovery Studio was used to analyze the expected interactions, performed in the GOLD software and viewed in the PyMol software. Of all the analyzed scoring functions, the ASP provided the best results, presenting small variations between the pose with lower RMSD and the pose with the best score. In addition, the in silico model was able to correctly predict the interactions between the amino acid residues with which lobelin interacts and the molecules of the literature. Thus, this methodology was applied in the virtual screening of the 28 nAChR $\alpha 7$ ligands, in combination with the molecular docking results of the bioactive compounds in the literature. In parallel, molecular dynamics studies were applied in order to optimize the 5AFN quality structure, which has 2.15 Å resolution. The scoring and RMSD data obtained for the lobelin protein-ligand interactions were higher in molecular dynamics studies. It was not possible to observe structural similarities between the spatial orientations of ligands with lobelin. One of the key residues of the active lobelin site, C186, is located in non-permissible regions (Ramachandran chart). In addition, the presence of solvent in the DM studies denatured the protein. Therefore, studies without DM were more effective.

Keywords: Agonist activity. Lobeline. nAChRs $\alpha 7$. Alzheimer's disease. Virtual screening. Ligand-receptor interactions. Molecular Dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina (1)	20
Figura 2: Representação do nAChR neural $\alpha 7$ homopentamérico, construído com o programa PyMol. As caixas amarelas representam as interfaces entre as subunidades $\alpha 7$, onde o sítio de ligação está localizado	23
Figura 3: Estrutura química de medicamentos aprovados pela FDA para o tratamento da doença de Alzheimer	25
Figura 4: Hidrólise enzimática da ACh pela AChE	26
Figura 5: Representação do processo de neurotransmissão de ACh	27
Figura 6: Representação esquemática do sítio de ligação da AChE feito com o programa PyMol	28
Figura 7: Mecanismo de hidrólise da ACh pela AChE	29
Figura 8: Os domínios extracelular (ECD), transmembrana (TMD) e intracelular (ICD) do nAChR $\alpha 7$, construídos com o programa PyMol.....	31
Figura 9: Substâncias com atividade destacada frente aos nAChRs $\alpha 7$	33
Figura 10: Modificações na estrutura química da tilorona, realizada por SCHRIMPF et al, 2013	34
Figura 11: Representação de nAChRs neurais $\alpha 4\beta 2$ construídos com o programa PyMol. Esferas vermelhas indicam onde a nicotina se liga ao receptor	35
Figura 12: Visão lateral e visão de zoom do sítio de ligação $\alpha 4\beta 2$ nAChRs com o agonista nicotina co-cristalizado	35
Figura 13: Modificações no ((S)-1-metilpirrolidin-2-il)metil benzoato, realizado por PARREGUEZ et al, 2013	37
Figura 14: Modelo proposto de sinalização gabaérgica na DA	39
Figura 15: Representação de neurotransmissão serotoninérgica, envolvendo os receptores 5-HT ₄ R e 5-HT ₆ R	42
Figura 16: Representação dos receptores serotoninérgicos no processo da hiperfosforilação da proteína Tau	43
Figura 17: Modificações em uma série de <i>N</i> -arilsulfonilindolas com seus respectivos valores de <i>k_i</i> frente ao receptor 5-HT ₆ , realizada por Vera (2016), Galivan (1999) e Mella (2017)	44
Figura 18: Representação de vias de sinalização em receptores de histamina.....	46

Figura 19: Ligantes selecionados da literatura e seus valores de afinidade frente ao receptor histamínico	47
Figura 20: Estrutura química do rolipram (52).....	48
Figura 21: Estrutura química de AC-1202 (61) e rosiglitazona (62)	51
Figura 22: Substâncias com potência destacada frente aos nAChRs $\alpha 7$ (BATISTA, 2016; BRIGGS, 1998; ZANALETTI, 2012)	53
Figura 23: Planejamento estrutural dos 28 fragmentos moleculares (68a-f, 69a-v), com padrão estrutural pirrolidínico, planejados como ligantes dos nAChRs $\alpha 7$	54
Figura 24: Estrutura química da lobelina (nAChRs $\alpha 7$ humano, $k_i = 6,26 \mu M$)	55
Figura 25: Gráfico de Ramachandran referente à estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ co-cristalizado com a lobelina (71)	64
Figura 26: Representação de ângulos diédricos Φ e Ψ de um aminoácido	65
Figura 27: Sítios pertencentes ao nAChR $\alpha 7$ quimérico: sítio ortostérico (amarelo), top pocket (magenta), vestibule pocket (vermelho), agonist sub-pocket (laranja)	65
Figura 28: Resíduos de aminoácidos referentes ao nAChR $\alpha 7$ quimérico co-cristalizado com a molécula 6-(4-bromofenil)-3-hidróxi-1,3- dimetil-2 <i>H</i> -piridin-4-ona (72) (PDB ID: 5AFJ), no subsítio agonista e resíduos de aminoácidos referentes ao nAChR $\alpha 7$ quimérico co-cristalizado com a molécula 4,5-dibromo- <i>N</i> -(3-hidróxiopropil)-1 <i>H</i> - pirrol-2-carboxamida (73) (PDB ID: 5AFM), no bolso do vestíbulo	66
Figura 29: Sobreposição dos átomos de ligantes co-cristalizados e redocados: a) entre a pose com menor valor de RMSD (asp, azul) e a lobelina co-cristalizada (cristal, laranja) e b) a pose com maior pontuação (asp, azul) e a lobelina co-cristalizada (cristal, laranja)	70
Figura 30: Pose melhor ranqueada pela função de pontuação ASP para o ligante co-cristalizado (71)	71

Figura 31: Pose melhor ranqueada pela função de pontuação ASP para o ligante 64 (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza), seguido de sua estrutura bidimensional com seu respectivo valor de <i>ki</i>	73
Figura 32: Compostos de padrão pirrolidínico selecionados com base nos estudos <i>in silico</i> , como candidatos a ligantes agonistas de nAChRs $\alpha 7$	77
Figura 33: Comparação entre a orientação espacial do (a) ligante 115 (ANEXO 11) co-cristalizado na AChBP a espécie <i>Aplysia californica</i> (3SQ6) (LI et al, 2011) e (b) ancorado no nAChRs $\alpha 7$, respectivamente. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Linhas tracejadas em amarelo representam átomos envolvidos em ligações de hidrogênio	77
Figura 34: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação ASP para o ligante 69h (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante 69h (verde)	79
Figura 35: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante 69e (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante 69e (verde)	80
Figura 36: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante 69b (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, verde) e do ligante 69b (laranja)	80
Figura 37: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante 69f (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante 69f (verde)	81
Figura 38: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante 69g (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante 69g (verde)	82
Figura 39: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante 69c (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e	

do ligante 69c (verde)	83
Figura 40: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante 69r (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante 69r (verde)	84
Figura 41: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante 69q (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante 69q (verde)	84
Figura 42: Sobreposição das poses melhor ranqueadas para os 8 fragmentos moleculares triados para a etapa de síntese. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza	85
Figura 43: Gráfico de Ramachandran referente à estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ obtida por dinâmica molecular	87
Figura 44: Avaliação do RMSD do nAChR $\alpha 7$ em função do tempo	88
Figura 45: Gráfico referente à energia total do sistema	88
Figura 46: Representação de ligações de hidrogênio presentes nas interações proteína-proteína	89
Figura 47: Representação de ligações de hidrogênio presentes nas interações proteína-solvente	90
Figura 48: Helicidade por resíduo em função do tempo	91
Figura 49: Gráfico correspondente ao comprimento da hélice do sistema	92
Figura 50: Giros por resíduo (em graus) em função do tempo	93
Figura 51: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação ChemScore para o ligante (lobelina) (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição dos átomos do ligante (lobelina, laranja) co-cristalizado com a estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ e do ligante (lobelina, verde) submetido à redocagem após os estudos de dinâmica molecular	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência do diagnóstico de AD em relação à idade e ao gênero	21
Tabela 2: Série de análogos de (2) proposta por Constanzo et al, 2016	30
Tabela 3: Modificações em 2-aminopiridinas substituídas com seus respectivos valores de K_i no receptor GABA, realizadas por PETERSEN, 2014	42
Tabela 4: Modificações em <i>N</i> -arilsulfonilindolas com seus respectivos valores de IC_{50} frente ao inibidor PDE4 , realizadas por Wang et al (2015), Duce; Bush (2010)	49
Tabela 5: Resíduos de aminoácidos com os quais a lobelina interage.....	65
Tabela 6: Comparação entre os resíduos de aminoácidos presentes nas estruturas cristalográficas do nAChR $\alpha 7$ quimérico co-cristalizado com as moléculas 71 (PDB ID: 5AFN, no sítio ortostérico), 72 (PDB ID: 5AFJ, no subsítio agonista) e 73 (PDB ID: 5AFM, no bolso do vestibulo) em relação ao nAChR $\alpha 7$ da espécie humana. Legenda: resíduos conservados (preto), resíduos com características físico-químicas semelhantes (azul) e resíduos com características físico-químicas distintas (vermelho)	66
Tabela 7: Dados de pontuação e RMSD obtidos através da redocagem da lobelina (70) para as quatro funções de pontuação do programa GOLD	69
Tabela 8: Interações previstas para os 8 compostos selecionados para síntese. Resíduos de interesse são destacados em vermelho	75
Tabela 9: Dados de pontuação e RMSD obtidos através da redocagem da lobelina (64) para as quatro funções de pontuação do programa GOLD	93
Tabela 10: Interações previstas para a lobelina de acordo com as funções de pontuação ASP, ChemPLP, ChemScore e GoldScore . Resíduos em vermelho são os de interesse	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

Å = Angstrom

ACh: Acetilcolina

Acetil-CoA: Acetil coenzima-A

AChE: Acetilcolinesterase

Aβ: proteína β-amilóide

cAMP ou AMP cíclico: Adenosina monofosfato cíclico

ASP : Astex Statistical Potential

APOE ε4: Apolipoproteína E ε4

ASP: Astex Statistical Potential

Best1: Bestrofina 1

BuChE: Butirilcolinesterase

CDK: *Quinase Cyclic Dependents* (Quinase dependente de ciclina)

CREB: AMP response element binding protein: Proteína de ligação a elementos de resposta AMP

DA: Doença de Alzheimer

FBVS: *Fragment-Based Virtual Screening* (Triagem Virtual Baseada em Fragmentos)

FDA: *Food and Drug Administration*

G12/G13: proteína G do tipo 12

GABA: Ácido Gamma Aminobutírico

GAT3: Transportador gabaérgico do tipo 3

cGMP ou GMP cíclico: Monofosfato cíclico de guanosina

GROMACS: *GROningen MAchine for Chemical Simulations*

GSK: Glicogênio sintase cinase

5-HT: Receptor de serotonina (5-hidróxitriptamina)

Cl₅₀: Refere-se à concentração na qual um fármaco, anticorpo ou toxina induz uma resposta na metade entre a taxa inicial e a máxima após um tempo especificado de exposição.

Ki: Constante de inibição

MMFF: *MerckMolecular Force Field* (Campo de Força Molecular de Merck)

nAChR α7: Receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo α7

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NMDA: *N-metil-D-aspartato*

NFT: *Neurofibrillary tangles* (Emaranhados neurofibrilares)

NTM: Núcleo tuberomamilar

OMS: Organização Mundial da Saúde

PDB : *Protein Data Bank* (Banco de Dados de Proteína)

PDEs: *Phosphodiesterases* (Fosfodiesterases)

PDPKs: *Proline-dependent protein kinases* (Proteínas quinases dependentes de prolina)

PLP - Piecewise Linear Potential

PM7: *Parametric Method 7* (Método Paramétrico 7)

PPA: Proteína precursora de amiloide

RMSD: *Root-Mean-Square Deviation* (Desvio da raiz quadrada media)

SNC: Sistema Nervoso Central

TMN: Núcleo tuberomamilar

TGF- β 1: *Transforming growth factor β 1* (Fator de Crescimento Transformador- β 1)

Resíduos de aminoácidos:

Ala (A): Resíduo do aminoácido alanina

Arg (R): Resíduo do aminoácido arginina

Asp (D): Resíduo do aminoácido aspartato

Asn (N): Resíduo do aminoácido asparagina

Cys (C): Resíduo do aminoácido cisteína

Gln (Q) : Resíduo do aminoácido glutamina

Glu (E): Resíduo do aminoácido glutamato

Gly (G): Resíduo do aminoácido glicina

His (H): Resíduo do aminoácido histidina

Ile (I): Resíduo do aminoácido isoleucina

Leu (L): Resíduo do aminoácido leucina

Lys (K): Resíduo do aminoácido lisina

Met (M): Resíduo do aminoácido metionina

Phe (F): Resíduo do aminoácido fenilalanina

Pro (P): Resíduo do aminoácido prolina

Ser (S): Resíduo do aminoácido serina

Thr (T): Resíduo do aminoácido treonina

Trp (W): Resíduo do aminoácido triptofano

Tyr (Y): Resíduo do aminoácido tirosina

Val (V): Resíduo do aminoácido valina

SÍMBOLOS:

α - alfa, referente à uma subunidade dos nAChRs

β - beta, referente à uma subunidade dos nAChRs

ρ 1-3 referente à uma subunidade dos receptores GABA_C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER: ASPECTOS GERAIS	20
1.2 ALVOS TERAPÊUTICOS ENVOLVIDOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	25
1.2.1 Enzima Acetilcolinesterase	25
1.2.2 Relação estrutura-atividade dos ligantes da enzima AChE.....	29
1.2.3. Receptores Nicotínicos de Acetilcolina do subtipo $\alpha 7$	31
1.2.4 Relação estrutura-atividade para ligantes de nAChRs $\alpha 7$	33
1.2.5 Receptores Nicotínicos de Acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$	34
1.2.6 Relação estrutura-atividade para os ligantes de nAChRs $\alpha 4\beta 2$	36
1.2.7 Receptor Gamma Aminobutírico	37
1.2.8 Relação estrutura-atividade para ligantes de receptores GABA _A	39
1.2.9 Receptor Serotoninérgico	41
1.3 Relação estrutura-atividade para ligantes do receptor serotoninérgico	43
1.3.1 Receptor Histamínico do subtipo H ₃	45
1.3.2 Relação estrutura-atividade para ligantes de receptores histamínicos	46
1.3.3 Enzima Fosfodiesterase	47
1.3.4 Relação estrutura-atividade para ligantes que atuam na enzima PDE4	48
1.3.5 Disfunções metabólicas	50
1.3.6 Substâncias em desenvolvimento	50
1.3.7 Fator de Crescimento Transformador- $\beta 1$	51
2. OBJETIVOS	52
3. PARTE EXPERIMENTAL	53
3.1 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	53

4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 METODOLOGIAS EMPREGADAS NA REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS COMPUTACIONAIS	55
4.1.1 ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DO RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA DO SUBTIPO $\alpha 7$	55
4.1.2 ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR PARA VALIDAÇÃO (REDOCAGEM)	56
4.1.3 CONSTRUÇÃO DA CLASSE DE SUBSTÂNCIAS DA LITERATURA E DAS SUBSTÂNCIAS PLANEJADAS COMO LIGANTES DE nAChRs $\alpha 7$	57
4.1.4 VALIDAÇÃO DO MODELO COM LIGANTES DA LITERATURA.....	58
4.1.5 ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR ENTRE OS COMPOSTOS PLANEJADOS E O MODELO VALIDADO DO nAChRs $\alpha 7$ (TRIAGEM VIRTUAL)	58
4.1.6 METODOLOGIAS EMPREGADAS NA REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR (DM)	59
4.1.7 PREPARO DA TOPOLOGIA.....	59
4.1.8 DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA HIPERCAIXA	61
4.1.9 SOLVATAÇÃO DA PROTEÍNA	61
4.2 MINIMIZAÇÃO ENERGÉTICA DA ESTRUTURA	62
4.2.1 EQUILIBRAÇÃO DO SISTEMA E DINÂMICA.....	62
4.2.2 ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR PARA VALIDAÇÃO (REDOCAGEM) DA ESTRUTURA OTIMIZADA POR DM.....	63
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 ANÁLISE DO MODELO <i>IN SILICO</i> DO nAChR $\alpha 7$	63
5.1.1 VALIDAÇÃO DO MODELO <i>IN SILICO</i> DO nAChR $\alpha 7$	67
5.1.2 CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES DA LITERATURA COM AFINIDADE FRENTE AO nAChR $\alpha 7$	67
5.1.3 ESTUDOS DE REDOCKING PARA VALIDAÇÃO	68
5.1.4 ANCORAGEM DOS LIGANTES DE nAChRs $\alpha 7$ DA LITERATURA PARA VALIDAÇÃO COMPLEMENTAR.....	72

5.1.5 TRIAGEM VIRTUAL DOS COMPOSTOS PLANEJADOS EM MODELO <i>IN SILICO</i> DOS nAChRs $\alpha 7$	74
5.1.6 ANÁLISE DOS COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE COM BASE NOS ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	75
5.1.7 ANÁLISE DO MODELO DO nAChR $\alpha 7$ OBTIDO POR DINÂMICA MOLECULAR (DM)	86
5.1.8 AVALIAÇÃO DO RMSD DO MODELO DO nAChR $\alpha 7$ OBTIDO POR DM	87
5.1.9 ENERGIA POTENCIAL	88
5.2 INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA X INTERAÇÃO PROTEÍNA-SOLVENTE	89
5.2.1 HELICIDADE POR RESÍDUO	90
5.2.2 GIROS POR RESÍDUO	92
5.2.3 ESTUDOS DE REDOCKING PARA VALIDAÇÃO PARA A ESTRUTURA OBTIDA POR DM	93
5.2.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS ESTUDOS COMPUTACIONAIS SEM E COM DINÂMICA MOLECULAR	96
6. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS.....	98
8. ANEXOS.....	106

1. INTRODUÇÃO:

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER: ASPECTOS GERAIS

A doença de Alzheimer (DA) tem o primeiro relato datado em 1906 por Alois Alzheimer, um psiquiatra clínico e neuroanatomista alemão. Desde então, na década de 1970, o interesse em investigar a doença cresceu significativamente (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003).

O mal de Alzheimer é considerado uma das formas mais comuns de demência entre a população mundial, correspondendo a 60-80% dos casos. Este transtorno neurodegenerativo progressivo se manifesta pela deterioração cognitiva e da memória, o qual está aliado à degradação de neurônios colinérgicos do Sistema Nervoso Central (SNC) e à redução significativa de neurotransmissores, em especial a acetilcolina (ACh, **Figura 1**) (VIEGAS et al, 2011). Com a diminuição desse neurotransmissor, os sinais químicos enviados de um neurônio para outro são afetados e isso acaba comprometendo significativamente as atividades diárias, gerando uma variedade de sintomas neuropsiquiátricos e de alterações comportamentais (CHENG; YAKEL, 2015).

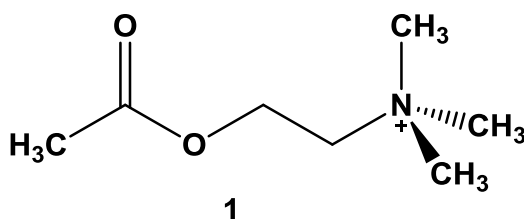


Figura 1: Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina (1).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2016), cerca de 9,9 milhões de idosos são afetados pela DA mundialmente a cada ano e se estima que essa doença atingirá 75 milhões de casos em 2030 e 132 milhões até 2050 (SPURNY et al, 2015), podendo acarretar em 490 mil mortes (JUMA, 2015). Sob o ponto de vista econômico, foi projetado que o custo anual advindo do tratamento relacionado aos cuidados de saúde por parte da população e dos órgãos governamentais de serviços de saúde mundialmente acabam gerando impactos econômicos de aproximadamente US\$ 818 bilhões no ano de 2015, passando a US\$ 200 trilhões até 2030 no mundo todo (HILLMER et al, 2013). No Brasil, a incidência e a prevalência da

doença de Alzheimer (DA) segue as estimativas mundiais, para o período de 2010-2020 tendem a ser relatados em torno de 55.000 novos casos por ano (CESTARI, 2013).

Notadamente, entre 3 e 5% da população pode manifestar esta desordem antes dos 60 anos e 6% da população, com 65 anos ou mais (KK, 2015). Sabe-se que o número de pessoas com a DA aumenta exponencialmente com a idade, passando de 3% entre 65 e 74 anos, para quase 50% entre indivíduos com mais de 85 anos (GUTIERREZ et al, 2014).

Nesse sentido, uma pesquisa foi realizada de 2008 a 2013, com 7637 pacientes, a fim de realizar uma análise comparativa entre a idade e o gênero de pacientes diagnosticados com DA, como pode ser observado na **Tabela 1** (MOJSA,2015):

Tabela 1: Frequência do diagnóstico de AD em relação à idade e ao gênero.

		Faixa etária			
		<65	65>	Total	
Gênero	Feminino	N	14	164	178
		%	7,90%	92,1	100%
	Masculino	N	1	48	49
		%	2%	98%	100%
Total		N	15	212	227
		%	6,60%	93,40%	100%

A partir dos dados obtidos, pode-se observar que, com menos de 65 anos, havia apenas 15 casos, o que equivale a 6,6% dos pacientes, tratando-se de um homem e 14 mulheres. No entanto, foram muito mais comuns casos de DA acima de 65 anos, o que equivale a 93,4% dos pacientes, incluindo 164 mulheres e 48 homens. Portanto, pode-se constatar que a prevalência da DA no gênero feminino foi superior ao gênero masculino (MOJSA, 2015).

O aumento da incidência da doença nas mulheres pode ser explicado por taxas de obesidade, diabetes e outras condições, que aumentam a probabilidade de desenvolver DA e, principalmente, o efeito negativo do APOE (alipoproteína E) ε4, o principal determinante genético da DA. A apolipoproteína E é um transportador de colesterol, que pode interagir com a proteína amilóide-β (Aβ), contribuindo para a agregação, o acúmulo e o

depósito da proteína A β no cérebro, propiciando a disfunção sináptica e a neurodegeneração (LIU et al, 2013, WOLF et al, 2013, QUIU et al, 2014).

Ostan e pesquisadores demonstraram que o APOE ϵ 4 feminino apresentou metabolismo hipográfico do cérebro generalizado e desbaste cortical em comparação com os portadores masculinos de APOE ϵ 4, que apenas um pequeno grupo de metabolismo hipocal e regiões de espessamento cortical, sugerindo que o impacto do APOE ϵ 4 no metabolismo e estrutura cerebral é fortemente dependente do gênero (OSTAN et al, 2016).

Outro fator envolvido na prevalência da DA em mulheres é atribuído aos hormônios sexuais. Durante o envelhecimento, a produção de hormônios diminui gradualmente nos homens (testosterona), enquanto que nas mulheres o estrogênio cai rapidamente após a menopausa quando a incidência da doença aumenta (HALL et al, 2015). Isso indica o quão esse problema é agravante para a saúde física e mental, deteriorando a qualidade de vida dessas pessoas.

Adicionalmente, a DA é uma doença multifatorial e está associada a diversos fatores de risco, tais como envelhecimento, tabagismo, sedentarismo, maus hábitos alimentares e doenças crônicas (diabete mellitus, hipertensão, isquemia cerebral, hipercolesterolemia), influência neurotóxica do alumínio proveniente da ingestão de água e da exposição crônica ao alumínio (Al). Além disso, a maioria dos casos é de origem genética e, nesta situação, estão inclusas anormalidades em genes relacionados à proteína β -amilóide, a qual é composta por 39-42 aminoácidos e é encontrada em depósitos extracelulares por todo o SNC. Essa proteína é formada pela clivagem da proteína precursora β -amiloide por ação das proteases β - e γ -secretases (CANNON, 2007).

Após formada em pessoas que apresentam a DA, fragmentos da proteína β -amiloide formam emaranhados fibrilares que se depositam no tecido neuronal, promovendo a formação de placas senis, que depositam no tecido neuronal (MAZUROV, 2011). Os emaranhados fibrilares são filamentos helicoidais contendo a proteína Tau, cuja função é estabilizar os microtúbulos dos axônios, estruturas responsáveis pela formação e manutenção dos contatos interneuronais. Entretanto, no caso da DA, quando

a proteína Tau passa pelo processo de hiperfosforilação, ela é modificada e suas funções são alteradas (AYLLÓN, 2011). Embora o papel das placas e dos emaranhados na doença de Alzheimer ainda não seja conhecido com precisão, eles são encontrados em maior abundância nas áreas do cérebro mais afetadas pela DA, ou seja, o hipocampo, córtex parietooccipital, córtex temporal e córtex frontal, levando à morte cerebral (PITHADIA, 2008). Além dessas alterações, ocorre a redução no número de sítios de ligação de acetilcolina no córtex cerebral em pacientes que sofrem com a doença, acarretando a diminuição dos níveis de receptores nicotínicos de acetilcolina (SCRIMPF, 2012).

Os receptores nicotínicos de ACh são comumente encontrados nas células neuronais, no Sistema Nervoso Periférico e no Sistema Nervoso Central, sendo compostos por uma variedade de subunidades α e β , as quais determinam as propriedades farmacológicas e cinéticas do receptor. No Sistema Nervoso Central, especificamente, há oito subunidades, α (entre elas: $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ e $\alpha 10$) e três subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (LOMBARDO; MASKOS, 2015). No entanto, os receptores nicotínicos do subtipo $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ são prevalentes no cérebro em comparação com os demais. O receptor $\alpha 7$ está concentrado no hipotálamo e no hipocampo e é composto por cinco subunidades $\alpha 7$ homopentaméricas (**Figura 2**) (SURESH; HANG, 2016).

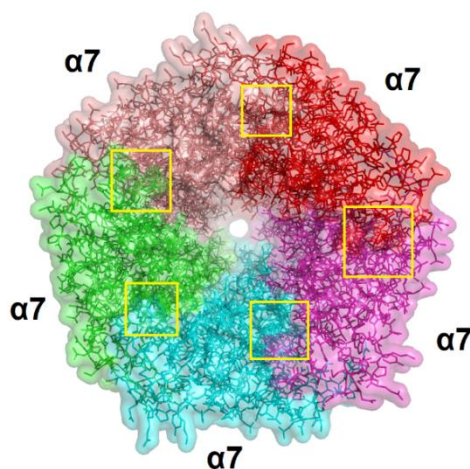


Figura 2: Representação do nAChR neural $\alpha 7$ homopentamérico, construído com o programa PyMol. As caixas amarelas representam as interfaces entre as subunidades $\alpha 7$, onde o sítio de ligação está localizado.

Estudos recentes com roedores indicam que os nAChRs $\alpha 7$ são responsáveis pelos efeitos neuroprotetores, amenizando a neurotoxicidade induzida pela proteína β -amiloide no córtex e no hipocampo (ETEGHAD et

al., 2015). Além disso, especialmente os nAChRs $\alpha 7$, possuem uma permeabilidade substancial a íons Ca^{2+} , colocando-os na lista de candidatos moduladores da plasticidade neuronal. A ativação dos nAChRs $\alpha 7$ também diminui a fosforilação da proteína Tau, inibindo a formação de emaranhados fibrilares, principal marcador intracelular para a doença de Alzheimer (ATZORI; OSCOS; ARIAS, 2016).

Diante dessas questões, a sociedade contemporânea enfrenta grandes desafios e lida com demandas crescentes neste novo século, evidenciando que a doença de Alzheimer é um fenômeno crescente e que ganha atenção especial de pesquisadores e especialistas nesta área de estudo. Portanto, há um debate crescente sobre como melhorar a qualidade de vida dessas pessoas afetadas e contribuir para a intervenção e prevenção desse problema (ROCCA et al, 2011; ALMEIDA et al, 2013; TEIXEIRA et al, 2015).

Com base na literatura atual, não há tratamentos disponíveis para retardar ou interromper o dano cerebral causado por DA. Alternativamente, recomenda-se tratamento não-farmacológico, incluindo atividades físicas, terapia ocupacional, musicoterapia e fisioterapia. Além disso, vários medicamentos prescritos podem amenizar temporariamente os sintomas de pessoas diagnosticadas com DA (FANG et al, 2017).

Sabe-se que o desenvolvimento da doença ocorre em três estágios (leve, moderada e grave). Os sintomas começam com o esquecimento, a perda irreversível de memória e o comprometimento das habilidades cotidianas. Assim, para melhorar as condições das pessoas com doença de Alzheimer, a U. S Food and Drug Administration (FDA) aprovou cinco medicamentos para tratar as sintomas da doença: donepezil **(2)** (Aricept®, 1996), galantamina **(3)** (Razadyne®, 2001), rivastigmina **(4)** (Exelon®, 2000), memantina **(5)** (Namenda®, 2003), Namzaric® (donepezil e memantina, 2014) **(Figura 3)** (CUMMINGS et al, 2015) .

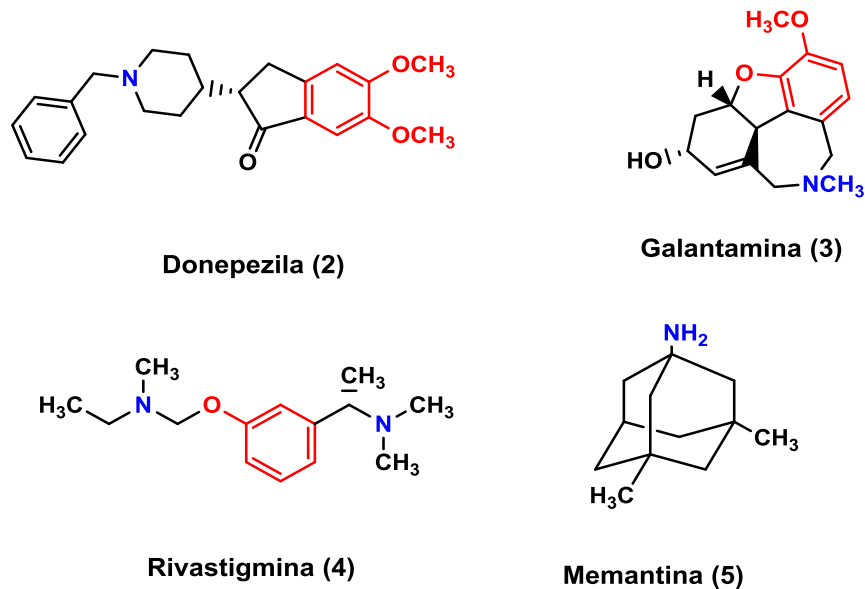


Figura 3: Estrutura química de medicamentos aprovados pela FDA para o tratamento da doença de Alzheimer.

Fármacos como **(2)**, **(3)** e **(4)** são inibidores da AChE (responsáveis pela prevenção da degradação da acetilcolina, que é importante para a memória e o pensamento) prescritos para DA leve a moderada. Portanto, esses fármacos podem ajudar a controlar, prevenir ou retardar os sintomas da doença. **(5)** é prescrito para tratar casos moderados a graves, ou seja, nos estágios posteriores da doença, ele regula o glutamato, um neurotransmissor que ajuda a manter habilidades comuns. Namzaric®, uma combinação de memantina e donepezila, foi aprovado para tratar casos moderados a graves (MOLINO et al, 2013).

1.2 ALVOS TERAPÊUTICOS ENVOLVIDOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER

1.2.1 Enzima acetilcolinesterase

O sistema colinérgico é uma porção do sistema nervoso periférico (SNP), que apresenta sinapses que possui o neurotransmissor acetilcolina. As sinapses colinérgicas são amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico, sendo importantes para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas. Eles também são encontrados na parte somática do SNP e nas junções ganglionares do sistema adrenérgico. Nas sinapses colinérgicas, existem dois tipos de colinesterases: a butirilcolinesterase (BuChE) e a acetilcolinesterase (AChE).

A BuChE está presente em sua maioria, no plasma sanguíneo, enquanto a AChE é mais abundante no sistema nervoso central, na membrana esquelética e eritrocitária (COLOVIC et al, 2013).

A acetilcolinesterase é uma enzima encontrada principalmente, nas junções neuromusculares e nas sinapses cerebrais colinérgicas e é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), que desempenha um papel importante nas funções cognitivas, como a aprendizagem e a memória (VIEIRA et al, 2016).

Estruturalmente, a acetilcolina possui um grupo éster e um grupamento amina quaternário. No neurônio pré-sináptico, a ACh é sintetizada a partir da colina e acetil-coenzima A (Acetil-CoA), sob catálise da colina acetiltransferase. Posteriormente, ele é armazenado em vesículas, até que haja um estímulo que resulte na fenda sináptica. A partir desse ponto, a ACh se liga à região pós-sináptica do neurônio, transmitindo a mensagem de um neurônio para outro. Após a transmissão da mensagem, a ACh se desliga do neurônio pós-sináptico e volta para a fenda sináptica, onde sofre hidrólise catalisada pela AChE, formando íon acetato e colina (**Figura 4**) (VIEIRA et al, 2016).

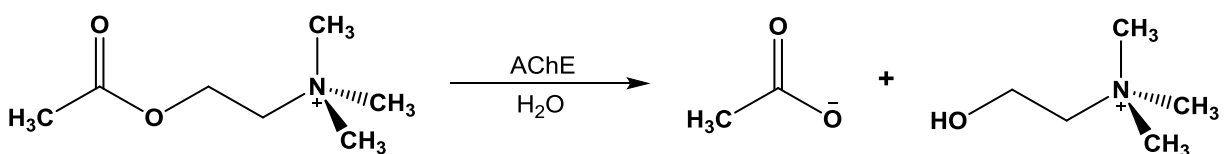


Figura 4: Hidrólise enzimática da ACh pela AChE.

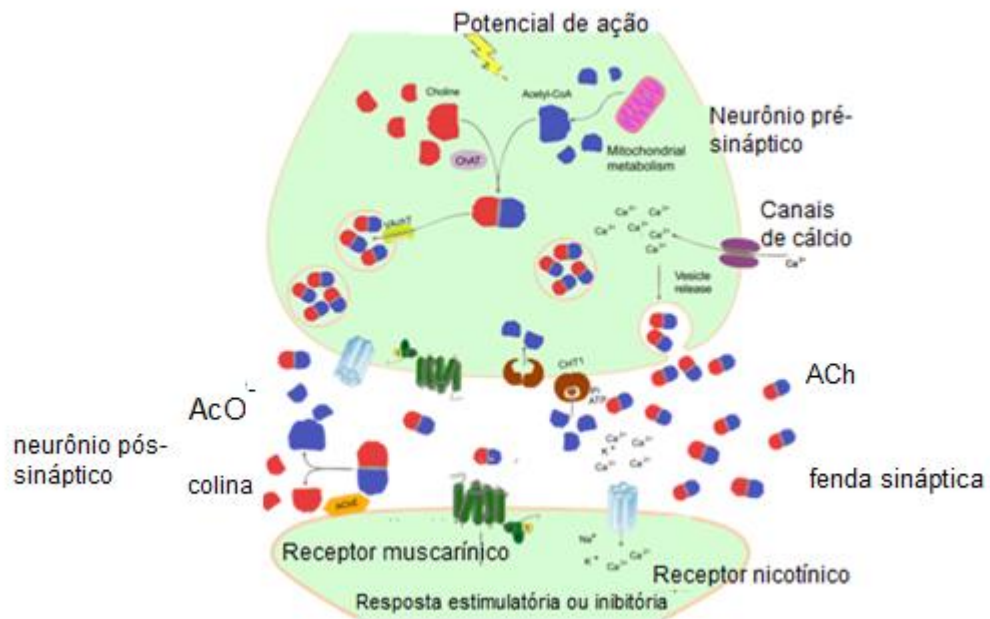


Figura 5: Representação do processo de neurotransmissão de ACh.
Fonte: Extraído de Vieira et al, 2016.

A AChE tem sítio ativo com características hidrofóbicas, no qual a ACh é hidrolisada. Existem dois pontos essenciais para a interação do neurotransmissor com a enzima. O primeiro é o sítio iônico, onde há interação entre o nitrogênio de carga positiva da ACh e a carga negativa produzida pelo resíduo de glutamato (G448) da AChE. O segundo é o sítio esteárico, onde o éster de ACh faz ligação de hidrogênio com o resíduo de tirosina (Y337) da AChE. Além de dois subsítios do centro ativo, a AChE contém um ou mais sítios aniônicos periféricos que servem para ligar ACh e outros ligantes quaternários, atuando como inibidores não-competitivos. Este sítio está envolvido nas características de inibição do substrato da AChE (ID do PDB ID: 1U65) (**Figura 6**) (COLOVIC et al, 2013).

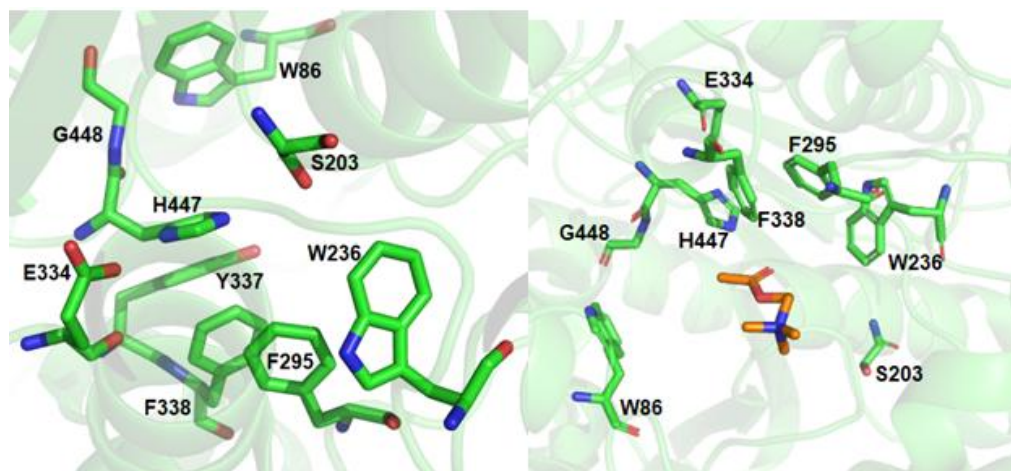


Figura 6: Representação esquemática do sítio de ligação da AChE (PDB ID: 1U65) e da ACh co-cristalizada na AChE (2HA4), feitas com o programa PyMol.

Existem também as subunidades catalíticas da AChE (código ID PDB: 1U65), que possuem aminoácidos fundamentais para a sua atividade: S203, H447 e E334 (tríade catalítica). A hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE depende dos resíduos de histidina (H447), que atuam como um catalisador ácido-base, e da serina (S203), que atua como um nucleófilo. De fato, a serina sozinha é incapaz de hidrolisar um éster, levando a histidina a um papel importante na catálise. Após a chegada da ACh ao sítio ativo da AChE, o par de elétrons da hidroxila do resíduo de serina ataca o carbono carbonílico da ACh. Além disso, a histidina atua como uma base removendo um próton da hidroxila (TÕUGU, 2001).

A histidina protonada age subsequentemente como um ácido, doando um próton para a subunidade colina da ACh, que é então liberada. A saída da subunidade colina deixa a enzima AChE acetilada, que sofrerá hidrólise, com a água atuando como nucleófilo. Em seguida, ácido acético é formado neste processo e o resíduo serina é regenerado, fazendo com que a enzima esteja pronta para agir novamente (**Figura 7**) (TÕUGU, 2001).

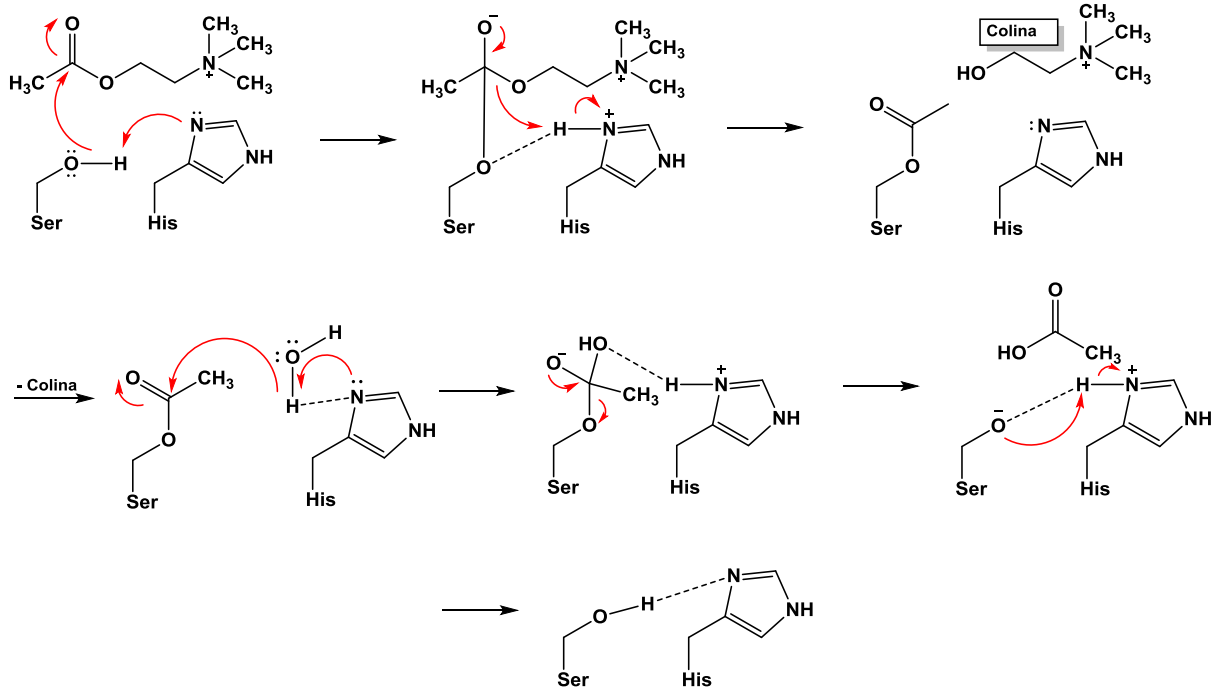
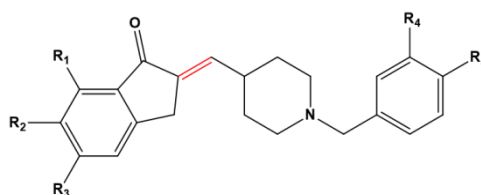


Figura 7: Mecanismo de hidrólise da ACh pela AChE (TÔUGU, 2017).

Ayllón e colaboradores verificaram que a AChE pode interagir com a proteína amilóide- β ($A\beta$) de maneira a promover a deposição de $A\beta$ nas placas. Além disso, a AChE pode induzir a mudança conformacional de $A\beta$ e desempenhar um papel na formação de fibrilas. Assim, a AChE- $A\beta$ é considerada mais neurotóxica do que os peptídeos $A\beta$ isolados (AYLLÓN et al, 2011).

1.2.2 Relação estrutura-atividade para os ligantes da enzima AChE

Para entender melhor como diferentes substituições afetam a afinidade por essa enzima, uma série de análogos de donepezil (**2**) foram selecionados da literatura (**Tabela 2**). Na **Tabela 2**, a ligação vermelha representa a ligação de (**2**) que é diferente da ligação dupla de seus análogos, sendo uma ligação simples no composto pai. Estes análogos mais rígidos foram concebidos para serem inibidores duplos da AChE e da β -secretase 1 (BACE-1), uma vez que ambas as enzimas são alvos para o tratamento da DA.



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	K _i (μM)
2	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	0,010
6	H	OH	H	H	H	4,224
7	OH	H	H	H	H	0,355
8	H	H	OH	H	H	1,980
9	H	OCH ₃	H	H	H	0,260
10	OCH ₃	H	H	H	H	1,835
11	H	H	OCH ₃	H	H	0,029

Tabela 2: Série de análogos de **(2)** proposta por Costanzo et al, 2016.

Nos compostos **6-8**, os grupos metoxila do donepezil foram removidos e os grupos hidroxila foram colocados nas posições R₁, R₂ ou R₃. Os compostos **9-11** seguem a mesma lógica, com a diferença de que os grupos metoxila são colocados nessas posições. A substituição da hidroxila do ligante **6** por um grupo metoxila resulta em maior afinidade pelo ligante **9**, sendo observado o mesmo padrão para os ligantes **8** e **11** e o oposto para os ligantes **7** e **10**. O posicionamento dos átomos do substituinte parece ser a chave para entender este padrão: assumindo que os hidrogênios do grupo metoxila de **9** estão participando de ligações de hidrogênio não-clássicas com algum resíduo de aminoácido e que o átomo de carbono onde eles estão ligados é paralelo ao R₁ hidrogênio, então o hidrogênio hidroxílico de **6** estaria muito longe do resíduo para imitar essa interação. A mesma hipótese explica a afinidade para os compostos **8** e **11**, assumindo que o grupo metoxila de **11** é paralelo e na direção oposta em relação ao caso anterior. Se **7** se comportar de maneira semelhante, então seu hidrogênio hidroxílico estaria próximo de onde o hidrogênio metoxílico de **9** seria e o carbono da metoxila de **10** estaria muito próximo ao resíduo, significando que **11** perde afinidade devido a efeitos estéricos. Para que isso aconteça, a energia de ligação global para o complexo AchE-7 teria que compensar a quebra de uma ligação interna de hidrogênio envolvendo o grupo hidroxila e o oxigênio do grupo cetona (COSTANZO et al, 2016).

1.2.3. Receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$

Os receptores de acetilcolina podem ser de dois tipos: receptores muscarínicos e nicotínicos. Ambos regulam o processo cognitivo e são afetados na doença de Alzheimer, reduzindo o número de sítios de ligação de acetilcolina no córtex cerebral de pacientes que sofrem da doença, levando a uma diminuição nos níveis desses receptores (GHONEIM; MEWALDT; PETERSEN, 1977; SARTER PAOLONE, 2011 apud LOMBARDO; MASKOS, 2015). Receptores nicotínicos de acetilcolina são geralmente encontrados no cérebro e são compostos de subunidades α e β , as quais são responsáveis por determinar as propriedades farmacológicas e cinéticas do receptor. (ALBUQUERQUE et al, 2009; GINIATULLIN et al, 2005 apud LOMBARDO; MASKOS, 2015).

Estruturalmente, nAChRs neuronais são glicoproteínas com cinco subunidades transmembranares organizadas em torno de um poro central permeável a cátions e fazem parte da família de canais iônicos loop-loop, que também incluem receptores de ácido gama aminobutírico ($GABA_A$ e $GABA_C$), receptores de glicina e serotonina ($5-HT_3$) (SPURNY et al, 2015).

Cada receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) é dividido em três domínios: um grande domínio extracelular *N*-terminal onde estão os sítios ortostéricos, um poro transmembranar e um pequeno domínio intracelular (SPURNY et al, 2015) (**Figura 8**).

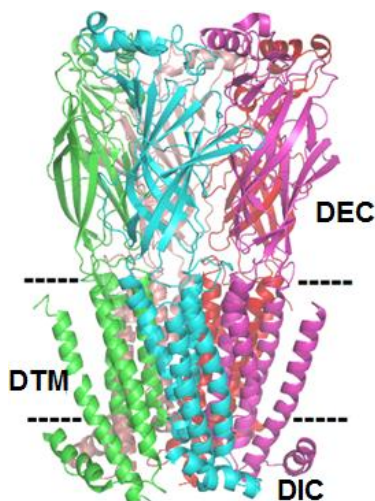


Figura8: Os domínios extracelular (DEC), transmembranar (DTM) e intracelular (DIC) do nAChR $\alpha 7$, construídos com o programa PyMol.

Fonte: Autoria própria

Os receptores nicotínicos de acetilcolina são especificamente ativados pelo neurotransmissor endógeno acetilcolina, que se liga ao domínio extracelular do receptor e desencadeia a abertura de uma porta de canal localizada no domínio transmembranar. Isso resulta em um fluxo de cátions Ca^{2+} através do poro do canal, que despolariza a membrana celular e inicia o potencial de ação (OZ et al, 2013).

A razão pela qual a proteína A β é acumulada preferencialmente nos tecidos hipocampais e corticais pode ser explicada pela prevalência de nAChRs $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ nessas regiões cerebrais (OZ et al, 2013). É devido à interação de alta afinidade de nAChRs e β -amilóide, como indicado pela excepcionalmente alta afinidade em ratos ($k_i = 4.1$) e porquinhos-da-índia ($K_i = 5.0$ pM) em estudos eletrofisiológicos (WANG et al, 2013). Wang e colaboradores relataram que ao interagir com nAChRs $\alpha 7$, a proteína A β poderia se acumular dentro da fenda sináptica das sinapses colinérgicas em quantidades suficientes para promover a formação de complexos A β /nAChRs $\alpha 7$. Isso afeta a função dos nAChRs $\alpha 7$ em neurônios do hipocampo, diminuindo a atividade, que pode reduzir a liberação de GABA e, conseqüentemente, reduzir a neurotransmissão colinérgica afetando a viabilidade dos neurônios (AULD et al., 1998 apud OZ et al. , 2013).

As opções terapêuticas atuais para o tratamento da doença de Alzheimer são limitadas, de modo que a busca pela cura da doença de Alzheimer é incessante. Considerando a alta incidência de pessoas afetadas pela doença, estudos envolvendo a busca de novos agonistas do nAChR $\alpha 7$ se mostram promissores para o tratamento da doença de Alzheimer.

Mazurov e colaboradores constataram a existência do derivado heterocíclico (SSR180711, **Figura 9**) **12** como agonista parcial eficiente no tratamento de distúrbios neurológicos como a esquizofrenia e a doença de Alzheimer. Ao analisar o perfil de **12**, foi comprovado alta afinidade pelos $\alpha 7$ nAChR em roedores ($k_i = 22$ nM) e em humanos ($k_i = 14$ nM). No caso, a ação do composto está associada ao aumento do fluxo de dopamina na região do córtex cerebral, contribuindo fortemente para o funcionamento da memória (MAZUROV, 2011; ZANALETTI et al, 2012).

O composto **13** atua como agonista eficiente no tratamento da esquizofrenia e da doença de Alzheimer, apresentando alta afinidade ($k_i = 11$ nM) em roedores e em humanos ($k_i = 6$ nM). Os mesmos pesquisadores relatam que o composto **14 (Figura 9)** atua como agonista parcial no tratamento da esquizofrenia e da doença de Alzheimer. No caso, foi verificada alta afinidade pelos nAChRs $\alpha 7$ ($k_i = 10$ nM) e pelos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ ($k_i = 2$ nM) em roedores, ao passo que apresentou baixa afinidade ($k_i = 1-10$ μ M) pelos nAChRs $\alpha 4\beta 2$ (MAZUROV, 2011).

O composto **15 (Figura 9)**, como agonista de nAChRs $\alpha 7$, foi capaz de aumentar o fluxo de cátions Ca²⁺ em roedores, na região do hipocampo, o que contribuiu fortemente para a melhoria na comunicação química entre os neurônios e, conseqüentemente, no processo cognitivo (MAZUROV, 2011). Segundo Mazurov e colaboradores, experimentos *in vivo* envolvendo o composto **16 (Figura 9)** constataram que este apresentou alta afinidade pelos nAChRs $\alpha 7$ ($k_i = 0,2-0,6$ nM), aumentando os níveis de acetilcolina nas regiões cerebrais e propiciando melhoria significativa no processo cognitivo em roedores. Para tanto, **16** é considerado agonista eficiente no tratamento da doença de Alzheimer. Por fim, o composto **17 (Figura 9)** demonstrou eficácia frente à disfunção cognitiva e à esquizofrenia e foi identificado como potente agonista para nAChRs $\alpha 7$ ($k_i = 4,3$ nM) em roedores.

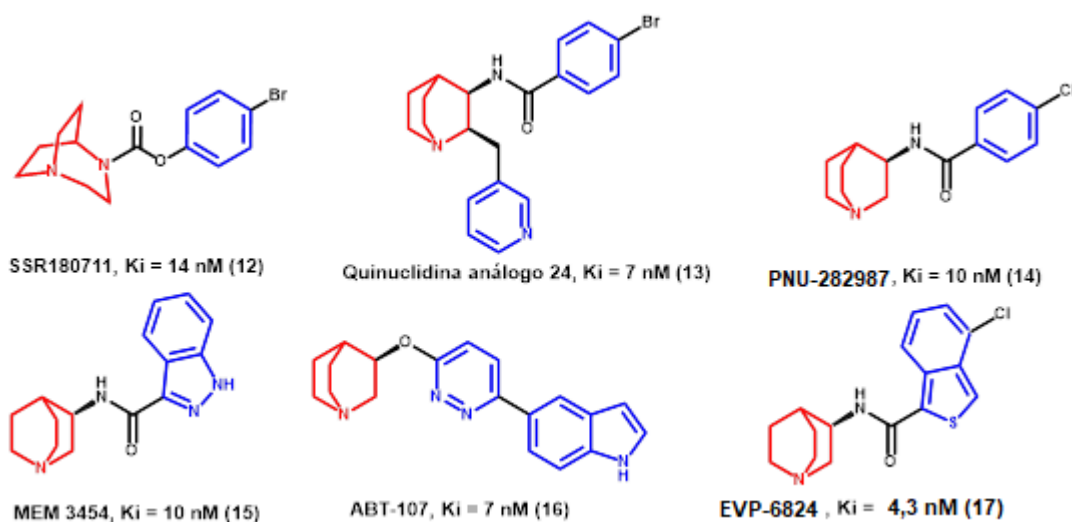


Figura 9: Substâncias com atividade destacada frente aos nAChRs $\alpha 7$.

1.2.4 Relação estrutura-atividade para ligantes de nAChRs $\alpha 7$

Michael e colaboradores desenvolveram uma série de compostos

(Figura 10) derivados da tilorona **(18)**, agonistas do receptor nicotínico $\alpha 7$ de ACh. Na **Figura 10**, está representada uma tilorona substituída e alguns análogos estruturais obtidos pelos pesquisadores que auxiliam na compreensão de como esses análogos estão relacionados à afinidade pelos nAChRs $\alpha 7$. Substituições feitas em R alteram consideravelmente a afinidade do composto para o receptor alvo devido ao fator de basicidade.

Nos compostos fluorenol **(19)** e fluoreno **(20)**, a diminuição da afinidade pode estar relacionada à perda do grupo carbonila, que é essencial para uma boa potência. A mesma situação é observada nas séries de dibenzotiofeno-dióxido **(21)**. Existe pouca diferença de afinidade entre os compostos **(22)** e **(23)** devido a desoxigenações ao sulfóxido **(22)** e sulfeto cíclico **(23)**, o que atende à afinidade de ligação. Além disso, a alteração do núcleo aromático de fluorenona em xantenona **(24)** aumenta a atividade de cerca de 200 vezes.

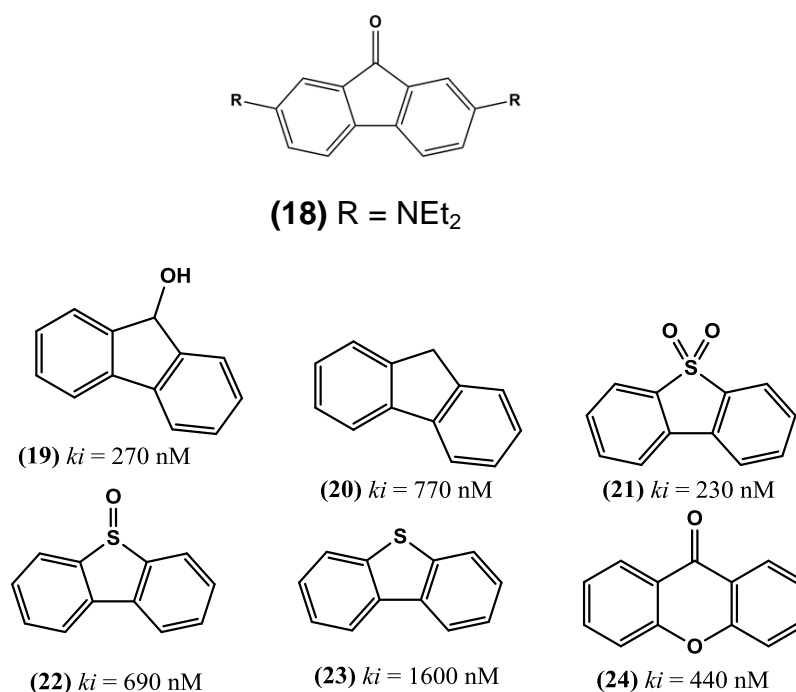


Figure 10: Modificações na estrutura química da tilorona, realizada por SCHRIMPF et al, 2013.

1.2.5 Receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$

Os receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$ ($\alpha 4\beta 2$ nAChRs) são compostos de subunidades $\alpha 4$ e $\beta 2$ em duas diferentes estequiometrias, podendo ser substituídos por duas subunidades α e três subunidades β ($\alpha 4\beta 2$)₂

$\beta 2$, resultando em dois sítios ortostéricos nas interfaces $\alpha 4/\beta 2$ ou por três subunidades α e duas subunidades $((\alpha 4\beta 2)_2 \alpha 4$, resultando em três sítios ortostéricos e sendo esse terceiro sítio localizado na interface $\alpha 4/\alpha 4$ (**Figuras 11 e 12**) (GRUPE et al, 2015; WANG et al, 2015; SURESH; HANG, 2016).

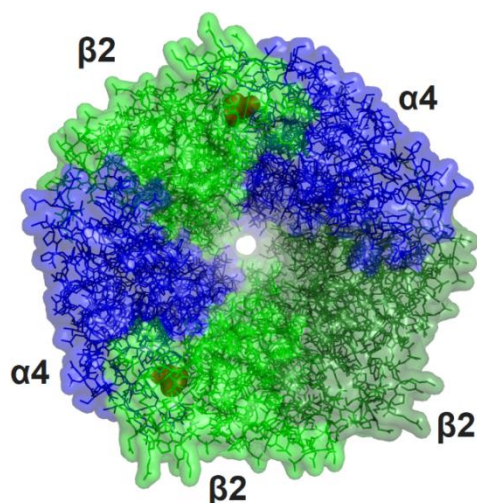


Figura 11: Representação de nAChRs neurais $\alpha 4\beta 2$ construídos com o programa PyMol. Esferas vermelhas indicam onde a nicotina se liga ao receptor.

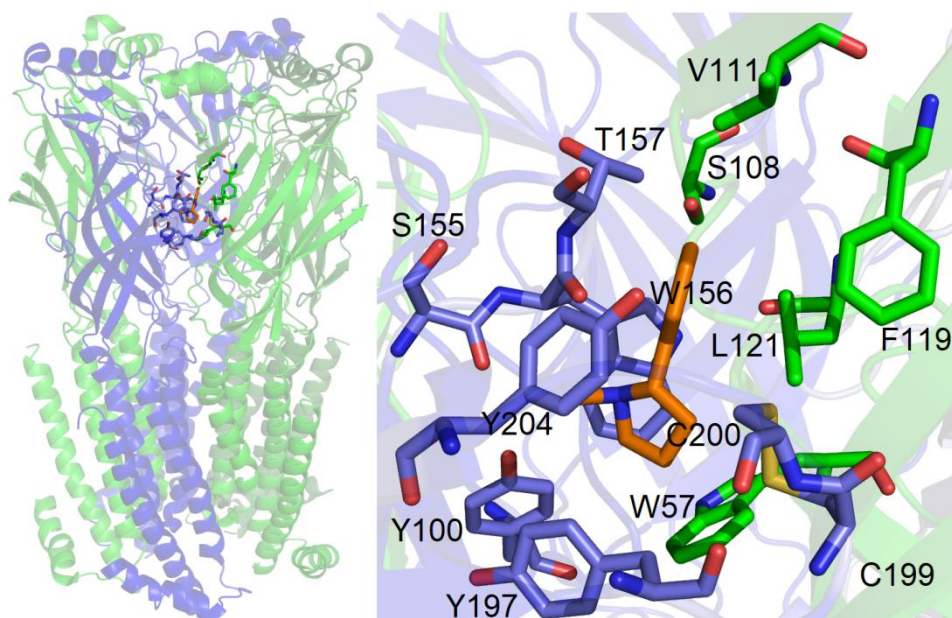


Figura 12: Visão lateral e visão de zoom do sítio de ligação nAChRs $\alpha 4\beta 2$ (PDB ID: 5KXI) com o agonista nicotina co-cristalizado.

Os nAChRs $\alpha 4\beta 2$ (PDB ID: 5KXI) são expressos em áreas do cérebro responsáveis por funções cognitivas, como o córtex, o hipocampo e o hipotálamo. De fato, eles também são encontrados no corpo estriado, no colículo superior, no núcleo geniculado lateral e no cerebelo e estão envolvidos

em distúrbios neurológicos e psiquiátricos que incluem depressão, epilepsia, esquizofrenia e doença de Parkinson (GRADY et al, 2007). Como esse tipo de receptor é altamente sensível à nicotina ($IC_{50} = 1,2 \text{ nM}$), está intimamente relacionado à dependência dessa substância em fumantes e para doença de Alzheimer (DA) (BRUNZELL, 2015).

No caso da doença de Alzheimer, eles desempenham um papel na função da memória, mediando a liberação de glutamato, aspartato, acetilcolina (ACh), GABA e dopamina. Portanto, nAChRs $\alpha 4\beta 2$ contribuem para a permeabilidade do íon Ca^{2+} dos receptores, que desempenha um papel na atividade pré-sináptica. Além disso, nAChRs $\alpha 4\beta 2$ abrem e ativam os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem por despolarização da membrana pré-sináptica para levar à liberação do neurotransmissor (PEREZ et al, 2016). Este processo está presente nos gânglios autonômicos, sinapses colinérgicas, dopaminérgicas, GABAérgicas, glutamatérgicas e noradrenérgicas, permitindo que a acetilcolina melhore as funções de atenção, aprendizagem e memória (WANG et al, 2015).

1.2.6 Relação estrutura-atividade para os ligantes de nAChRs $\alpha 4\beta 2$

Tomando como ponto de partida o ((S)-1-metilpirrolidin-2-il) metilbenzoato (**25**), algumas modificações de Parreguez e colaboradores (**Figura 13**) foram representadas na **Figura 13**, sobre as quais algumas considerações podem ser feitas sobre a relação estrutural entre **25** e seus análogos estruturais e o receptor alvo (nAChR $\alpha 4\beta 2$). Em primeiro lugar, o **25** pode interagir com o receptor heteromérico $\alpha 4\beta 2$ através de interações cátion- π , exibindo alta afinidade (23,4 nM) com ele. De fato, as interações entre o receptor e a região destacada na molécula **25** são características hidrofóbicas. Adicionalmente, a introdução de subunidades hidrofóbicas tais como quinolina (**26**), piridina (**27**), **32** e nitrobenzeno (**28**) substituídas levou a substituintes de afinidade mais baixas do grupo benzeno por subunidades mais hidrofóbicas produzindo compostos tendo afinidade e potência iguais ou maiores, como pode ser observado para os compostos **33**, **27** e **30** (PARREGUEZ et al, 2013). Em comparação, o composto **29** exibiu maior afinidade ($k_i = 8,1 \text{ nM}$) do que o composto **25**. No caso, o aumento da afinidade pode estar relacionado com a

introdução do grupo amino na posição meta do anel aromático no composto **25**. Além das interações hidrofóbicas, a presença de um potencial doador e receptor de ligações de hidrogênio favorece uma interação entre o composto e o receptor alvo. Observando o composto de maior afinidade desta série (**33**), pode-se inferir que isso se deve à presença de um oxigênio aceitador de ligação a hidrogênio em uma posição próxima à do nitrogênio da molécula **29** (PARREGUEZ et al , 2013).

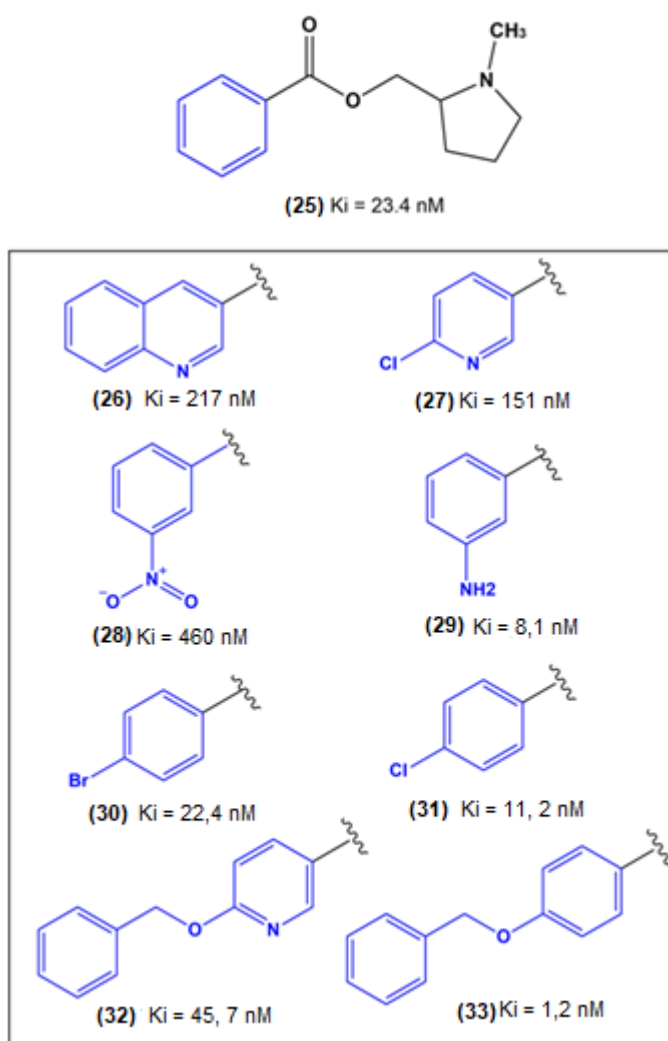


Figura 13: Modificações no ((S)-1-metilpirrolidin-2-il)metil benzoato, realizado por Parreguez et al, 2013.

1.2.7 Receptor gama aminobutírico

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC), amplamente distribuído no cérebro de mamíferos e envolvido no controle da excitabilidade cortical (LI et al, 2016; MANDAL, KANSARA; DABAS 2017; GRILL , 2010). Existem três subfamílias,

dentre elas os receptores GABA_A, GABA_B e GABA_C. No caso, os receptores GABA_A têm cinco subunidades que contêm duas subunidades α , duas β e uma γ , a combinação mais comum do receptor GABA no cérebro de mamíferos (o que as torna uma estrutura pentamérica) e formam um canal de íons Cl⁻, o qual pode ser bloqueado por ligantes. São responsáveis por mediar a maior parte da inibição rápida no cérebro. O GABA_B é um receptor metabotrópico que se associa à proteína Gi/go e, através deste processo, abre o canal de K⁺ ou inibe o Ca²⁺, regulando a atividade neuronal (LI et al, 2013).

Primeiro, ocorre a síntese do neurotransmissor GABA a partir do glutamato pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico. Uma vez sintetizado, é transportado no axônio para terminais pré-sinápticos até as vesículas pela ação do transportador vesicular GABA. Induzida pelo potencial de ação, a membrana despolariza e o neurotransmissor GABA é possivelmente liberado das vesículas pré-sinápticas para a fenda sináptica. Assim, a maior parte do neurotransmissor GABA ativa os receptores GABA na membrana pós-sináptica, resultando em inibição fásica. Outro tipo de inibição consiste na inibição tônica, que é mediada principalmente por receptores GABA_A extra-sinápticos que contêm a subunidade π na maioria das regiões do cérebro e receptores GABA A que contêm a subunidade $\alpha 5$, especialmente no hipocampo. Os astrócitos e os receptores GABA_B também podem participar desse processo. No caso, os astrócitos liberam GABA e este, por sua vez, pode ativar os receptores GABA_A e GABA_B como área extra sináptica, conferindo efeito inibitório (SCIMEMI, 2014).

Na sinalização GABAérgica da DA, a proteína A β formada no cérebro induz a entrada de cálcio na fenda pré-sináptica. Aumentando as possibilidades de concentração de cálcio, há ativação de receptores pós-sinápticos, especialmente os receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), aumentando a ativação do receptor GABA A para amortecer a superexcitação. Nos astrócitos, o glutamato pode sintetizar e liberar GABA via canal GAT3 / 4 ou bestrofina 1 (Best1). A liberação de GABA, sob condições de DA, ativa os receptores extra-sinápticos GABA_A e GABA_B e a cognição pode ser prejudicada. Uma vez ativada, a ligação da PP2A com a proteína Tau é reduzida, resultando em hiperfosforilação da Tau e ativação dos interneurônios GABAérgicos, o que

acaba interrompendo o circuito neuronal e levando a problemas de cognição (Figura 14) (LI et al, 2013).

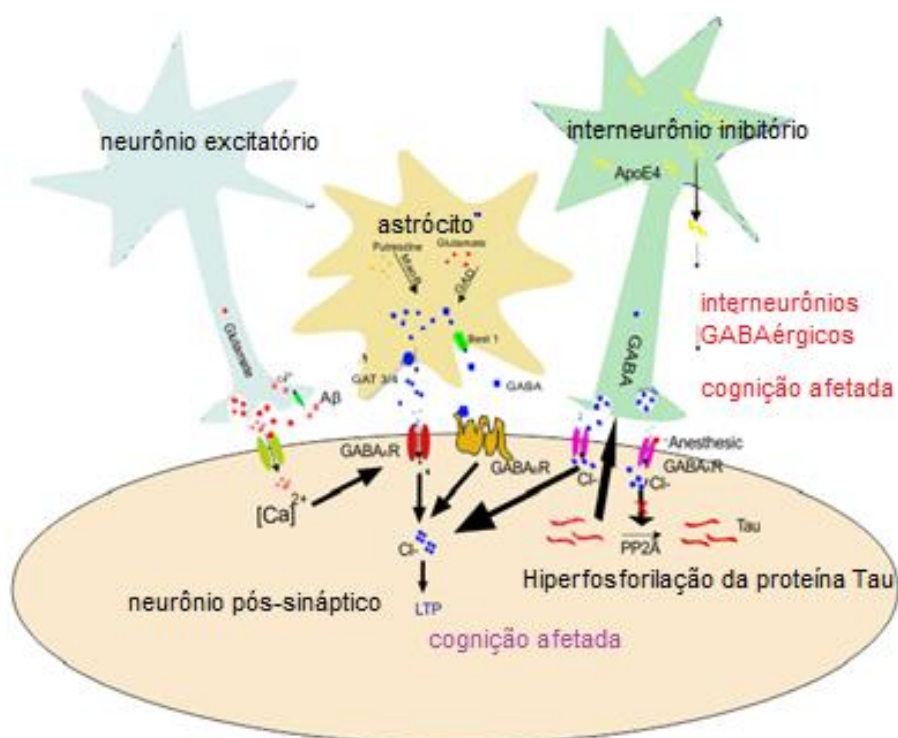


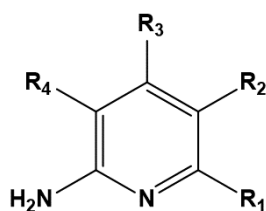
Figura 14: Modelo proposto de sinalização gabaérgica na DA.
Fonte: Adaptado de Mandal, 2017.

Estudos recentes com modelos de camundongos com DA e tecido cerebral post-mortem indicaram um grande envolvimento entre o neurotransmissor inibitório GABA e a memória em pacientes com doença de Alzheimer, permitindo que permite que o GABA seja um importante fator patológico e terapêutico. Mandal e colaboradores compararam os níveis de GABA nas regiões cerebrais frontal, parietal e temporal entre pacientes com DA e pessoas saudáveis por meio da espectroscopia de ressonância magnética (ERM). Com base nesse processo, os pesquisadores verificaram que havia níveis significativamente mais baixos de GABA e neurotransmissores de glutamato nas regiões cerebrais dos pacientes com DA, afetando as funções sinápticas, glutamatérgicas e a transmissão neuronal levando à perda cognitiva e de memória em pacientes com DA (MANDAL, 2017).

1.2.8 Relação estrutura-atividade para ligantes de receptores GABA_A

Para avaliar como diferentes substituições afetam a afinidade para o

receptor GABA_A, uma série de 2-aminopiridinas substituídas foram selecionadas da literatura (**Tabela 3**).



Composto	R	K _i (μ M)
34	R ₁ = CO ₂ H	>100
35	R ₁ = CH ₂ CO ₂ H	>100
36	R ₂ = CO ₂ H	4.4
37	R ₂ = CH ₂ CO ₂ H	90
38	R ₃ = CO ₂ H	19
39	R ₃ = CH ₂ CO ₂ H	73

Tabela 3: Modificações em 2-aminopiridinas substituídas com seus respectivos valores de K_i no receptor GABA, realizadas por Petersen, 2014.

Os compostos **34-39** são uma série de 2-aminopiridinas substituídas em que os pesquisadores introduziram sistematicamente substituintes de ácido acético e fórmico ao redor do anel aromático. A substituição do átomo de hidrogênio nas posições R₁ e R₂ do anel aromático não substituído pelas duas funções de ácido carboxílico anteriormente mencionadas produziu compostos sem afinidade para o receptor, nomeadamente os compostos **34** e **35**. As mesmas substituições nas posições R₂ e R₃, resultando nos compostos **36-39**, resultaram em maior afinidade, com os derivados do ácido fórmico apresentando menor *ki* do que seus análogos de ácido acético. Como alguns dos ligantes mencionados não têm afinidade com o receptor, é possível inferir que as interações nessa região não estão relacionadas aos efeitos eletrônicos induzidos sobre o anel pelas substituições, mas sim às interações eletrostáticas

entre as funções do ácido ionizado e alguns aminoácidos. Esta hipótese parece correta se olharmos para os ligantes desta série que tinham *ki* mensurável: Embora ambos os derivados de ácido acético tenham *ki* do mesmo grau de magnitude, o composto **39** tem melhor afinidade que o composto **37**, que se acredita ser substituído na posição ideal, dado que o ligante **36** tem a melhor afinidade para o receptor. Isto é razoável se os modos de ligação forem semelhantes para esta série, devido à possibilidade de rotação em torno das ligações do anel R1 e do carbonato de metileno. Como o grupo carregado de **36** parece estar otimamente posicionado, a introdução de um carbono de metileno pode resultar em um posicionamento diferente e menos favorável desse grupo no ligante **37**, sendo esse melhor posicionamento imitado melhor por **39** do que por **37**, explicando assim os dados observados. Se esta hipótese estiver correta, também é razoável supor que os ligantes são orientados no espaço por uma forte interação intermolecular envolvendo seu nitrogênio de amina e um resíduo de aminoácido, provavelmente uma ligação de hidrogênio. Isso é proposto com base na suposição de modos de ligação semelhantes entre as séries (PETERSEN, 2014).

1.2.9 Receptor serotoninérgico

O receptor de serotonina (5-HT) é um dos neurotransmissores mais estudados no Sistema Nervoso Central (SNC), importante para regular funções fisiológicas, como controle da raiva, agressividade, temperatura corporal, apetite, sono, humor e dor. Portanto, esquizofrenia, depressão e ansiedade são algumas das condições fisiopatológicas associadas às alterações do metabolismo da 5-HT ou à sinalização serotoninérgica. Além das funções regulatórias mencionadas anteriormente, seu papel também consiste em regular outros sistemas de neurotransmissores, como ACh, dopamina, GABA e glutamato (CLAEYSEN, 2015).

A serotonina é produzida por pequenos aglomerados de neurônios serotoninérgicos amplamente distribuídos em quase toda a estrutura cerebral, o que a torna envolvida em processos de aprendizagem e memória. Existem quatorze (14) subtipos de receptores 5-HT expressos em áreas cerebrais responsáveis pelos processos de aprendizagem e memória, mas os principais são 5-HT₁, 5-HT₄ e 5-HT₆. A este respeito, com base em estudos com

camundongos, Butzlaff e Ponimaskin mostraram que o número de neurônios serotoninérgicos diminuiu em conjunto com o 5-HT, notavelmente 5-HT_{1A}, 5-HT₄ e 5-HT₆, e seus metabólitos em cérebros com DA após a morte. Os receptores antagonistas de 5-HT_{1A} estão presentes nos núcleos do hipocampo e córtex, desempenhando um papel na memória e aprendizado, o que os tornam alvos promissores em pacientes com DA. Isso porque eles são capazes de aumentar a transmissão (pré e pós-sináptica) colinérgica (BUTZLAFF; PONIMASKIN, 2016).

Os receptores 5-HT₄ são encontrados no cérebro e expressos no tubérculo olfatório, nos gânglios da base e no hipocampo. Sugere-se que esse receptor seja um alvo eficiente no tratamento da DA. No contexto da DA, a ativação da neurotransmissão serotoninérgica leva a efeitos que medeiam um tipo de ação. Por exemplo, o receptor 5-HT₄ é ativado induzindo a clivagem não amiloidogênica da proteína precursora de amiloide (PPA) pela α -secretase (ADAM10) ou β -secretase (BACE1), o que possibilita a liberação da alfaPPA solúvel (sPPA α) que apresenta propriedades neurotróficas e neuroprotetoras, uma vez que podem memória reversa e dificuldades de aprendizagem (**Figura 15**) (GELDENHUYS; SCHYF, 2011).

Os receptores antagonistas de 5-HT₆ estão concentrados principalmente nas regiões cerebrais estriatal, hipocampal e cortical, que estão associadas à memória e à aprendizagem. Sabe-se que os receptores 5-HT₆ são co-localizados com os neurônios GABAérgicos, uma vez ativados; estes receptores aumentam os níveis de neurotransmissão GABAérgica e acetilcolina. Isso pode reverter a perda cognitiva e tratar a DA, pois inibe a toxicidade da proteína A β , modula os receptores NMDA e bloqueia a formação de poros mitocondriais (CLAEYSEN, 2015).

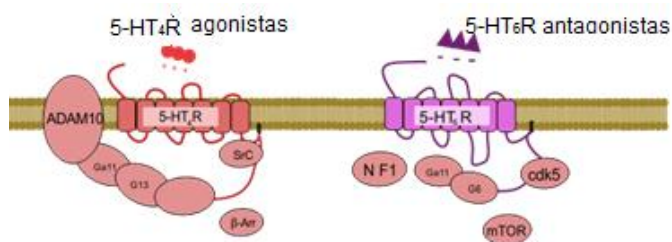


Figure 15: Representação de neurotransmissão serotoninérgica, envolvendo os receptores 5-HT₄R e 5-HT₆R.

Fonte: Adaptado de Butzlaff; Ponimaskin, 2016.

De acordo com a literatura, existem várias explicações sobre a relação entre receptores de serotonina e emaranhados neurofibrilares (NFT), levando à fosforilação da proteína Tau, que é exacerbada na DA. Existem evidências de que o 5-HT₆ pode interagir e ativar a quinase dependente de ciclina 5 (CDK5), uma das proteínas quinases piruvato desidrogenase (PDPKs), mas a interação entre 5-HT₆ e CDK5 para formar NFT ainda não foi avaliada. Sabe-se que ambas as subunidades Ga12 e Ga13 ativam a glicogênio sintase quinase 3β (GSK-3β), de modo que a ativação da GSK-3β por Ga13 é mediada por Rho enquanto a ativação por Ga12 é independente de Rho. Isto significa que o acoplamento de receptores de serotonina com proteínas G12/G13 contribui para a modulação da atividade de GSK-3β e, conseqüentemente, contribui para a fosforilação de Tau e DA. Assim, os receptores 5-HT₄ e 5-HT₇ podem ativar as proteínas G12/G13 e GSK-3β (Figura 16) (BUTZLAFF; PONIMASKIN, 2016).

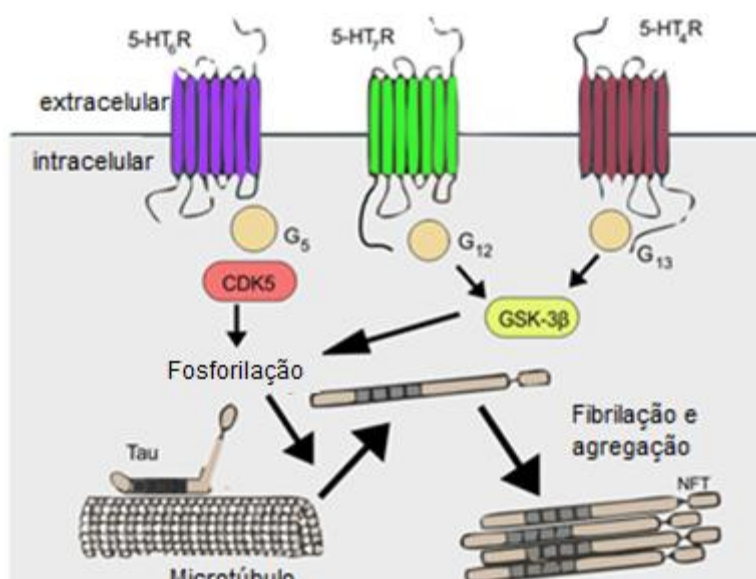


Figure 16: Representação dos receptores serotoninérgicos no processo da hiperfosforilação da proteína Tau.

Fonte: Adaptado de Butzlaff; Ponimaskin, 2016).

1.3 Relação estrutura-atividade para ligantes do receptor serotoninérgico

Para avaliar como diferentes substituições afetam a afinidade para este receptor, uma série de *N*-arilsulfonilindoles foi selecionada da literatura (Figura 17).

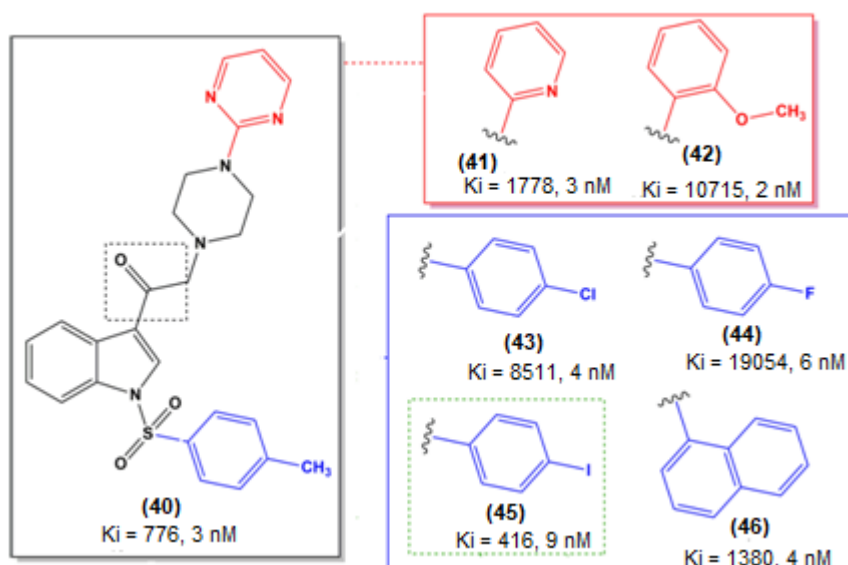


Figura 17: Modificações em uma série de *N*-arilsulfonilindolas com seus respectivos valores de k_i frente ao receptor 5-HT₆, realizada por Vera (2016), Galivan (1999) e Mella (2017).

Tomando o derivado de serotonina **(40)** (VERA, 2016), um antagonista do receptor 5-HT₆, como referência e começando a fazer alterações na porção 4-metil-fenila (azul) enquanto a porção pirimidina (vermelha) se mantém inalterada, resultados interessantes foram identificados em relação à afinidade frente a este receptor. A substituição do ligante de metila deste fragmento pelo cloro **(43)** resulta em diminuição de afinidade de aproximadamente 10 vezes. A substituição da mesma metila pelo flúor **(44)** torna a afinidade ainda mais baixa, com diminuição de 25 vezes em relação ao composto original **(40)**. As evidências relatadas sugerem que esta subunidade aromática poderia participar de interações nas quais é preferível que ela seja menos deficiente em elétrons, como evidenciado pelo composto **(45)** tendo quase duplicado a afinidade pelo receptor, como interações tipo cátion-pi e empilhamento- π . Esta hipótese parece ser precisa, dado que o iodo é mais polarizável do que o cloro e o flúor, embora seja capaz de doar alguma densidade eletrônica ao anel e que o grupo metila possa hiperconjugar com o anel, doando modestamente a densidade eletrônica. A substituição da subunidade 4-metilfenila por 1-naftaleno **(46)** diminui a afinidade para o receptor quase em 2 vezes, indicando que o local de ligação permite algum grau de liberdade em relação ao tamanho destes anéis aromáticos, já que o tamanho do anel teve menor influência no k_i para o

receptor do que a densidade eletrônica do anel e sabendo que as interações cátion-pi são de longa distância (até 6 Å, essa hipótese ganha força (GALLIVAN, 1999).

Partindo de **(40)** e mudando a pirimidina (vermelha) para uma piridina **(45)** enquanto deixa a porção 4-metilarilsilfonil (azul) inalterada resulta em um decréscimo de mais de 2 vezes na afinidade, enquanto que a substituição da mesma porção por um anel 2-metoxifenila produz uma perda maior de afinidade, quase 14 vezes. Isto indica que o aumento da densidade eletrônica desta porção diminui a afinidade, pelo fato de que o anel pode participar de uma interação empilhamento- π ou mesmo de uma interação ânion- π .

1.3.1 Receptor Histamínico do subtipo H₃

A histamina é produzida por várias células, como basófilos, mastócitos, neurônios, linfócitos e células semelhantes à enterocromafina gástrica. Entre os quatro subtipos de receptores de histamina, o H₃ é o mais expresso em regiões do cérebro humanas como córtex cerebral, gânglios da base e hipotálamo, que são importantes para a modulação homeostática, sono e cognição (NADDAFI; MIRSHAFIEY, 2013). Atua como autoreceptor pré-sináptico e heterorreceptor pós-sináptico (GRILL; CUMMINGS, 2016) e atua como neurotransmissor no sistema nervoso periférico (SNP) e no Sistema Nervoso Central (SNC), desempenhando papel crucial na memória e na aprendizagem (NADDAFI; MIRSHAFIEY, 2013).

Vohora e Bhowmik relataram que foi possível detectar redução nas quantidades de histamina no hipotálamo, no hipocampo e no córtex temporal de cérebros com DA. Isso se deve à alta densidade de emaranhados neurofibrilares (NFT) que circundam os neurônios histaminérgicos tuberomamilaes, degenerando o núcleo tuberomamilar (TMN) que forma as fibras histaminérgicas, o que indica perda de histamina nos neurônios e, conseqüentemente, disfunção histaminérgica. As fibras histaminérgicas originadas da TMN estão disseminadas no hipotálamo, no córtex cerebral, no tálamo, nos gânglios da base, na amígdala e no hipocampo; áreas associadas a funções sensoriais e motoras, cognição, atenção, aprendizagem e memória **(Figura 18)** (VOHORA; BHOWMIK, 2014).

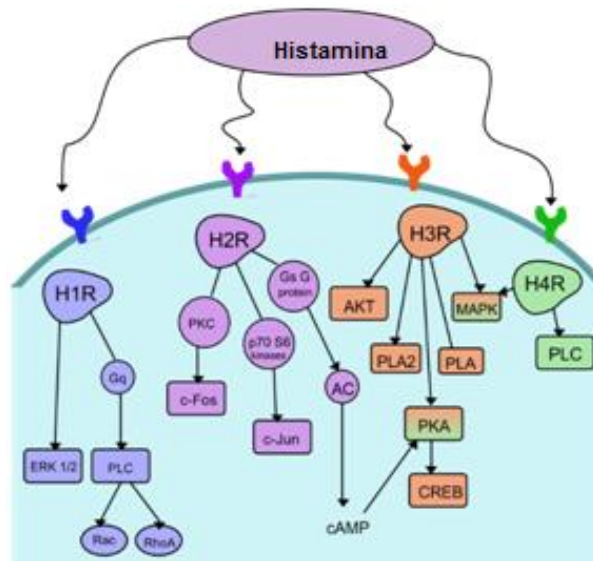


Figura 18: Representação de vias de sinalização em receptores de histamina.

Fonte: Adaptado de Vohora; Browmik, 2014.

1.3.2 Relação estrutura-atividade para ligantes de receptores histamínicos

A maior parte dos antagonistas do receptor H₃ humano demonstram uma estrutura modelo similar: Uma porção básica, que é usualmente uma amina terciária, substituída por um grupo alquila, com este ligante tendo frequentemente um grupo funcional polar. O ligante também pode ser substituído por um núcleo aromático central que pode ser conectado a porções ácidas, lipofílicas, polares ou básicas que constituem a região arbitrária, sendo essa região responsável por modular a potência e as propriedades farmacocinéticas desses ligantes (WINGEN, 2013). Usando este padrão como guia, uma série de ligantes foi selecionada da literatura para avaliar como diferentes substituições afetam sua afinidade pelo receptor de histamina.

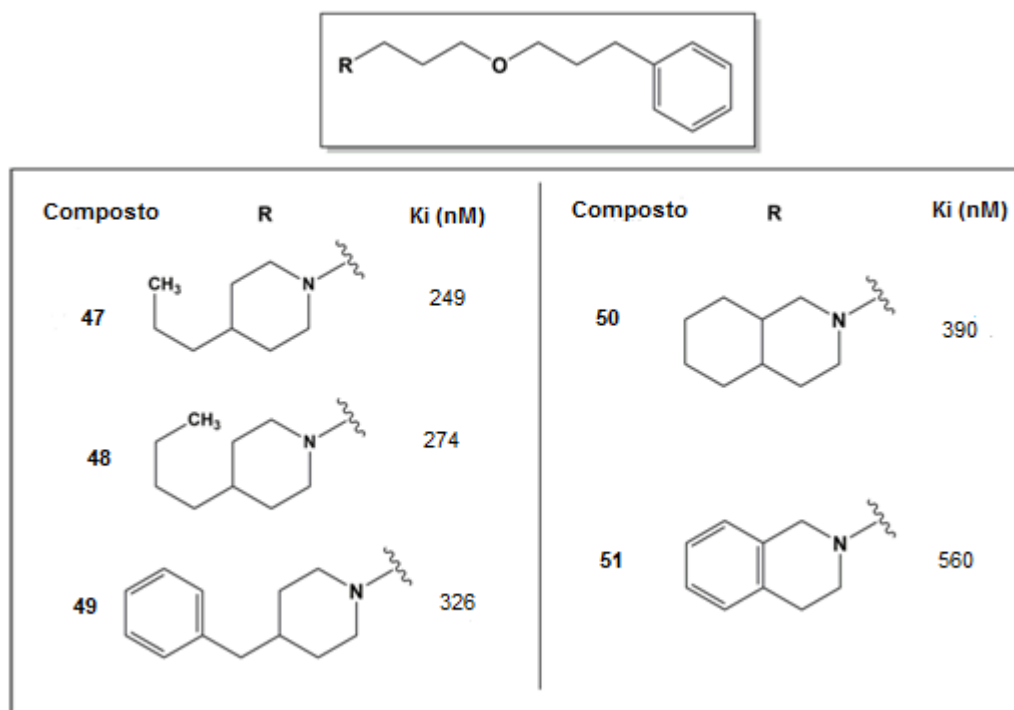


Figura 19: Ligantes selecionados da literatura e seus valores de afinidade frente ao receptor histamínico.

Na **Figura 19**, o ligante é uma cadeia alcóxi hidrofóbica ligada a um grupo fenila e os grupos R são anéis de piperidina substituídos. A alteração do grupo propila de **47** para grupos maiores resulta em perda progressiva de afinidade, com as moléculas menos tensionadas tendo maior afinidade. A introdução de um grupo benzila e a fusão de um grupo fenila com o anel de piperidina (compostos **49** e **51**, respectivamente) resulta também em perda de afinidade. O composto **50**, uma piperidina bicíclica, também tem afinidade reduzida quando comparado com **47**, mas o seu valor de Ki é menor do que o observado para **51**. Tomando esta informação juntamente com os outros compostos para esta série leva à conclusão de que as interações desta porção são principalmente hidrofóbicas e mais fortes quando o anel tem algum grau de flexibilidade, mas elas não são ótimas quando este é o caso, dado que a afinidade é maior para os grupos R de cadeia aberta (WINGEN, 2013).

1.3.3 Enzimas fosfodiesterases

As fosfodiesterases de nucleotídeo cíclico (PDEs) são enzimas capazes de controlar a taxa de hidrólise de adenosina monofosfato cíclico

(cAMP ou AMP cíclico) e de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). É possível encontrar onze tipos de PDEs (PDE1-PDE11), de modo que a PDE3 e a PDE6 não parecem ter funções neurais porque são expressas em baixos níveis no SNC, em contraste com outras PDEs (OSTA et al, 2012). No caso, a PDE4 é altamente concentrada no SNC e se encontra predominantemente no córtex, estriado, mesencéfalo, cerebelo, bulbo olfatório, amígdala, tálamo e hipocampo (HECKMAN, 2015).

Entre as isoformas PDE4A, 4B, 4C e 4D, a PDE4D desempenha o papel mais importante no processo cognitivo, o que a torna um alvo promissor para várias doenças caracterizadas pelo comprometimento da memória, principalmente a DA (RICCIARELLI; FEDELE, 2015). Para este propósito, um inibidor específico de PDE4 conhecido como Rolipram (**52**) foi testado em Tg2576 e em modelo de camundongo transgênico APP/PS1 para observar seus efeitos de cognição. Com base nesses testes, verificou-se uma diminuição da fosforilação de CREB (pCREB) e consequente melhoria da memória em Tg2576 e em APP/PS1. Neste estudo, não houve alterações nos níveis de proteína A β da placa nos camundongos modelo AD ou Tg2576. Assim, se o pCREB for ativado, as sinapses serão mais resistentes aos efeitos do dano A β (HECKMAN, 2015). Se a PDE4D for silenciada no hipocampo, ocorre diminuição do AMPc induzido por AB e déficit de memória, atenuando a neuroinflamação e conferindo neuroproteção na DA (RICCIARELLI; FEDELE, 2015).

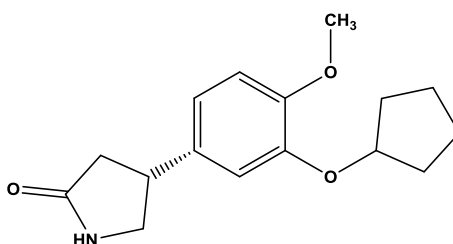
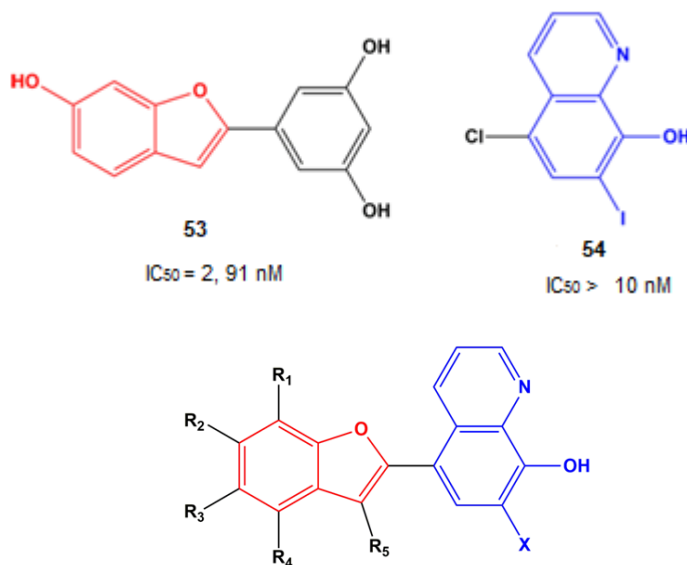


Figura 20: Estrutura química do rolipram (**52**).

1.3.4 Relação estrutura-atividade para ligantes que atuam na enzima PDE4

Discutir como algumas variações estruturais afetam a atividade frente à PDE4D, uma série de ligantes proposta por Wang et al, onde selecionados da literatura. Esses ligantes são baseados na fusão dos farmacóforos de duas substâncias: Moracina M (**53**) (WANG et al, 2015), um produto natural que atua como um inibidor da enzima PDE4D, e clioquinol (**54**) (DUCE; BUSH, 2010), um

agente quelante de metais. Este último é usado porque íons metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} , podem se ligar a $\text{A}\beta$ via resíduos de histidina e assim facilitar sua agregação.¹ Também, é sabido que a interação entre íons metálicos que são redox-ativos e $\text{A}\beta$ sob condições fisiológicas geram espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo e morte neuronal em pacientes com DA (DUCE; BUSH, 2010).



Composto	R	X	IC ₅₀ (μM)
55	H	H	> 10
56	R ₁ = OH	H	> 10
57	R ₂ = OH	H	> 10
58	R ₃ = OH	H	2, 31
59	R ₂ = R ₄ = OH	H	1, 21
60	R ₃ = OH, R ₅ = CH ₃	H	3, 67

Tabela 4: Modificações em *N*-arilsulfonilindolas com seus respectivos valores de IC₅₀ frente ao inibidor PDE4, realizadas por Wang et al (2015), Duce; Bush (2010).

Partindo do ligante (**55**), tendo IC₅₀> 10 μM , e introduzindo primeiro os grupos hidroxila em diferentes posições no anel benzofurânico, mantendo X = H, obteve-se resultados interessantes. Em primeiro lugar, a introdução do referido grupo nas posições 1 (**56**) e 2 (**57**) teve efeito na atividade para a enzima, com ambos os ligantes possuindo IC₅₀> 10 μM . Introdução de um grupo hidroxila na posição 5 (**58**) aumenta a atividade para 2,31 μM . Agora fazendo R2 e R4 ambos os grupos hidroxila (**59**) resulta em aumento da atividade para a enzima alvo, com IC₅₀= 2,21 μM , enquanto fazendo R3 = OH e R5 = CH₃(**60**) resultou em um ligante menos potente, com IC₅₀ = 3,67 μM (WANG et al, 2015).

1.3.5 Disfunções metabólicas

Ishii e Iadecola relataram que o metabolismo da glicose também é um fenômeno observado na DA, pois a glicose é uma substância altamente energética cuja quebra no interior das células libera a energia armazenada nas ligações químicas e produz gás carbônico e água. Assim, se ocorrer disfunção no metabolismo oxidativo e energético na DA, isso pode ser explicado pela disfunção metabólica na degradação glicolítica da glicose e oxidação do piruvato (ISHII; IADECOLA, 2015). Estudos realizados por Mushtaq, Khan e Kamal (2015) revelaram que o consumo de oxigênio, a glicose e o fluxo sanguíneo foram menores nas regiões frontal, parietal e temporal dos cérebros com DA. Também foi sugerido que o metabolismo anormal da glicose na região parietotemporal na DA é o principal fator metabólico que contribui para a disfunção sináptica em pacientes com DA. Além disso, existem receptores de insulina expressos no cérebro, envolvendo o bulbo olfatório, o córtex, o hipocampo, a amígdala e o hipotálamo. Portanto, além da sinalização da insulina que regula o peso corporal, o metabolismo sistêmico e a reprodução, ela regula a proteína A β e Tau, o que a torna ativa na cognição e na memória (MUSHTAQ; KHAN; KAMAL, 2015).

Um fato interessante é que tanto a insulina quanto a proteína A β são degradadas pela enzima degradadora de insulina (EDI). No entanto, a sinalização de insulina pode ser interrompida por A β e este fato pode ser investigado por análise pós-morte de pacientes com DA. Se uma pessoa tem níveis anormais de insulina no metabolismo (hiperinsulinemia) a IDE apresentará menor capacidade de degradar A β , causando deposição de A β , que contribui para a disfunção da memória, e desenvolvimento de DA (CUMMINGS, 2015).

1.3.6 Substâncias em desenvolvimento

Lauren e pesquisadores do Colorado investigaram **61** em ensaios clínicos de fase IIa. Os pesquisadores relataram que a atividade terapêutica de **61** em uma dose única de 40 g foi avaliada em 20 indivíduos com idade média de 74 anos com diagnóstico de DA ou comprometimento leve da cognição. A

administração dessa molécula elevou os níveis da barreira hematoencefálica (BHB) e revelou melhora significativa na cognição. Em ensaios clínicos de fase IIB, **61** em uma dose de 20 g ou placebo por 90 dias foi aplicado em 152 pacientes com DA leve a moderada e os resultados foram consistentes com aqueles de estudos de fase II (COSTANTINI et al, 2008).

Martina e pesquisadores da Universidade de Frankfurt investigaram os efeitos do agonista rosigitazona (**Figura 21, 62**) em pacientes com DA, avaliando sua segurança e eficácia. Em um ensaio clínico de fase III, pacientes com DA receberam por via oral **62** por 6 meses e os resultados foram favoráveis, beneficiando o comprometimento da cognição. O segundo estudo consistiu em analisar 518 pacientes com DA leve a moderada que receberam 1 dose de **62** uma vez ao dia. A maioria dos pacientes era do sexo feminino, portanto, foi considerada a relação entre o alelo APOE*E4 e o risco de DA para detectar seu efeito na cognição. Os pacientes com APOE * E4 negativos receberam 2, 4 e 8 mg, mas os resultados não foram benéficos. Então, em um terceiro estudo, considerando o alelo APOE*E4, 581 pacientes receberam 1 dose de **62**, mas não foi efetivo novamente porque apresentou efeitos adversos sérios, portanto o candidato não foi recomendado a continuar os estudos (MILLER; WILLETT; DESILETS, 2011).

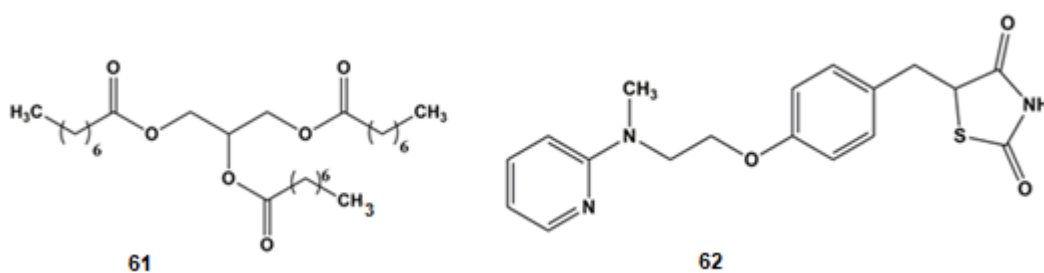


Figura 21: Estrutura química de AC-1202 (**61**) e rosigitazona (**62**).

1.3.7 Fator de Crescimento Transformador-β1

Diniz e pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) conseguiram impedir o progresso da doença de Alzheimer em animais, concentrando-se no estudo chamado Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1). Eles descobriram a importância dessa proteína para proteger os circuitos elétricos do cérebro, já que o TGF-β1 pode regular a formação de sinapses excitatórias. Eles concluíram verificando a produção de astrócitos de hipocampo

CA1 cultivados *in vitro* e *in vivo* com TGF- β 1, de modo que os astrócitos foram expostos a oligômeros A β e observaram que os níveis de TGF- β 1 diminuíram nessas células. Assim, os oligômeros A β foram injetados no hipocampo de camundongos e o mesmo efeito ocorreu, indicando que uma vez reduzida a produção de TGF- β 1, isso causa inflamações que interrompem a conexão entre os neurônios (DINIZ et al, 2017).

Em um estudo comportamental com roedores, os pesquisadores da UFRJ já conseguiram reduzir alguns sintomas da doença de Alzheimer. Os animais recuperaram sua memória mais recente e se sabe que uma das principais conseqüências da doença é justamente a perda de memória recente. Neste estudo, foi realizado um teste cognitivo, por meio do qual um rato foi colocado na frente de dois objetos idênticos durante cinco minutos. Uma hora depois, um dos objetos foi substituído. Segundo os pesquisadores, o animal reagiu da mesma forma, ou seja, não se lembrava dos objetos que já havia visto. Após injetar a molécula de TGF- β 1, o roedor lembrou do primeiro objeto e apenas reagiu ao novo, o que ele não conhecia (DINIZ et al, 2017).

Assim, por ser um alvo terapêutico recentemente encontrado na literatura, não há estudos relacionados às substâncias em fase de desenvolvimento ou relação estrutura-atividade para este alvo.

2. OBJETIVOS:

Este trabalho visa a identificação de substâncias de padrão estrutural pirrolidínico inéditas, potencialmente ativas frente aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do subtipo α 7, que possam ser úteis na descoberta de novas alternativas para o tratamento da doença de Alzheimer. Para tal, podemos descrever as metas específicas a seguir:

- Realização de estudos computacionais entre a estrutura cristalográfica do nAChR α 7 e ligantes da literatura para validação e compreensão de características estruturais relevantes dos receptores nicotínicos de acetilcolina;
- Utilização do modelo computacional validado para a triagem virtual (*in silico*) dos compostos inéditos mais promissores para a etapa de síntese e avaliação farmacológica como perspectivas futuras.

3. PARTE EXPERIMENTAL:

3.1 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL:

São descritas na literatura diversas substâncias que apresentam atividade destacada *in vitro* em receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do subtipo $\alpha 7$, dentre as quais podemos destacar os exemplos a seguir (BATISTA, 2016; BRIGGS, 1998; ZANALETTI, 2012).

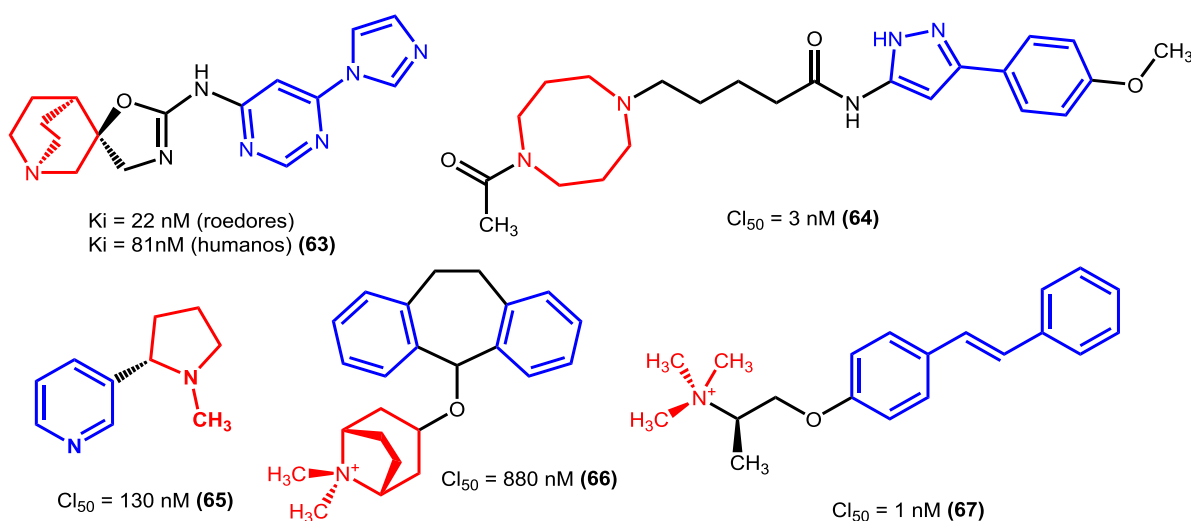


Figura 22: Substâncias com potência destacada frente aos nAChRs $\alpha 7$ (BATISTA, 2016; BRIGGS, 1998; ZANALETTI, 2012).

Ao observarmos as estruturas das substâncias **63-67**, podemos destacar algumas subunidades estruturais que podem ser relacionadas quimicamente, como as subunidades aromáticas (em azul) e as subunidades contendo um átomo de nitrogênio básico ou carregado positivamente (em vermelho). Na interação com o biorreceptor alvo, estas duas subunidades estruturais podem contribuir de forma semelhante para resultar na atividade *in vitro* observada (BATISTA, V. S.; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2016).

Com base nas substâncias bioativas frente aos nAChRs $\alpha 7$, conforme exemplificado na **Figura 22**, pode-se propor uma nova classe de substâncias, como pode ser observado nas **Figura 23**. O núcleo estrutural pirrolidínico (em vermelho) foi inspirado pelas subunidades cíclicas/bicíclicas, ou contendo um átomo de nitrogênio básico ou carregado positivamente. As substâncias **64**, **65** e **67** mostram que a subunidade bicíclica não é essencial

para a atividade, de modo a permitir o planejamento de substâncias estruturalmente mais simples. Já as subunidades aromáticas (em azul) da **Figura 22** inspiraram a introdução das subunidades aromáticas ou alifáticas, visando buscar interações semelhantes no reconhecimento molecular com o biorreceptor alvo.

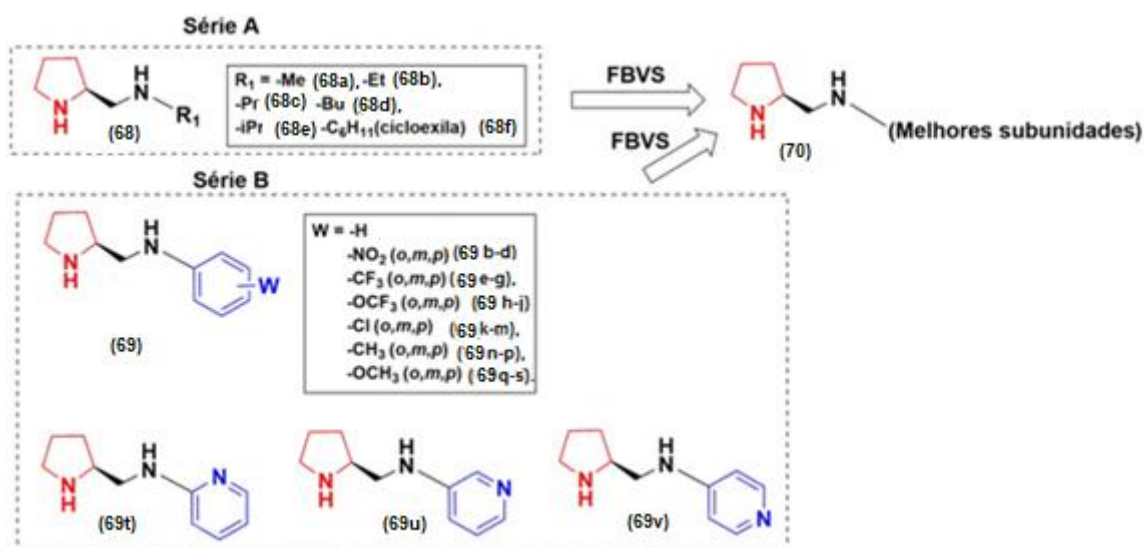


Figura 23: Planejamento estrutural dos 28 fragmentos moleculares (**68a-f**, **69a-v**), com padrão estrutural pirrolidínico, planejados como ligantes dos nAChRs α 7.

Na **Série A**, em R_1 , são propostos substituintes alifáticos de forma homóloga (**68a-d**), seguido das variações em **68e** e **68f**, de modo a avaliarmos até que ponto o volume e superfície moleculares podem contribuir para as interações ligante-biomacromolécula. Na **Série B**, W explora o anel aromático não-substituído e substituído em diferentes posições (*orto*, *meta* e *para*), explorando o efeito estérico e eletrônico em diferentes posições e com diferentes características (elétrons-doadores e elétrons-retiradores), de modo a avaliarmos até que ponto estes substituintes podem contribuir para o reconhecimento molecular. Estes fragmentos serão triados *in silico* por meio da estratégia de triagem virtual baseada em fragmentos moleculares (FBVS), onde os 8 melhores fragmentos serão eleitos para a etapa de síntese, em perspectivas futuras (SCOTT, 2012; SANT'ANNA, 2009).

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 METODOLOGIAS EMPREGADAS NA REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS COMPUTACIONAIS

4.1.1 ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DO RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA DO SUBTIPO $\alpha 7$

A estrutura cristalográfica quimérica do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ (PDB ID: 5AFN), co-cristalizado com a lobelina (**71**) foi obtida a partir do site do Protein Data Bank (PDB), para a qual se definiu as coordenadas de referência ($x = 38.5534$, $y = -15.7578$ e $z = -1.4681$), sendo o átomo de nitrogênio do anel piperidínico da lobelina utilizado para os estudos de ancoragem molecular. A estrutura quimérica apresenta resolução de 2,15 Å e a técnica utilizada para sua elucidação foi a difratometria de raios-X (SPURNY et al, 2015).

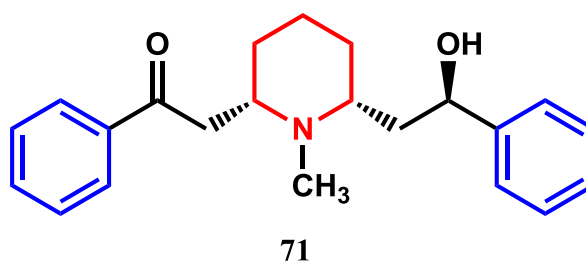


Figura 24: Estrutura química da lobelina (nAChRs $\alpha 7$ humano, $k_i = 6,26 \mu\text{M}$).

De posse dessa informação, analisou-se a proteína de interesse pelo gráfico de Ramachandran para verificar os ângulos diédricos phi (ϕ) e psi (ψ). O software PyMol foi utilizado para inspeção visual da estrutura cristalográfica, a qual apresentou resultados adequados para a realização dos estudos *in silico*, pois apenas 11 resíduos de aminoácidos, que não são resíduos-chave do sítio ativo da lobelina, estão localizados nas regiões não-permitidas. A segunda análise consistiu em verificar os sítios pertencentes ao nAChR $\alpha 7$ quimérico, bem como identificar quais resíduos de aminoácidos são modulados pela lobelina. Posteriormente, os arquivos com extensão.fasta contendo as sequências primárias dos nAChRs $\alpha 7$ quimérico

e do nAChR $\alpha 7$ da espécie humana foram obtidos do sítio proteômico NCBI (do inglês, National Center for Biotechnology Information) a fim de alinhá-las no programa NCBI-Blast (**ANEXO 1**) e comparar se os resíduos de aminoácidos dos sítios pertencentes à lobelina são conservados no nAChR $\alpha 7$ humano de modo a justificar os estudos computacionais com a estrutura quimérica.

4.1.2 ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR PARA VALIDAÇÃO (REDOCAGEM)

Visto que essa estrutura cristalográfica está co-cristalizada com a lobelina, a redocagem foi utilizada como método de validação. Neste método, o mesmo ligante co-cristalizado com o biorreceptor em questão é submetido aos estudos de ancoragem molecular, de modo a avaliar a capacidade preditiva do modelo *in silico* em relação à orientação espacial do ligante (RMSD, Root Mean Square Deviation) e as interações com resíduos de aminoácidos relevantes para a atividade. Em seguida, o arquivo .pdb foi aberto no programa GOLDSuite (v.5.4) e submetido ao estudo de ancoragem no modo rígido, avaliando-se todas as funções de pontuação (ChemScore, GOLDScore, ASP e ChemPLP) do programa, de modo a selecionarmos a melhor para as etapas posteriores. As coordenadas de referência ($x = 38.5534$, $y = -15.7578$ e $z = -1.4681$) usadas nos estudos de ancoragem molecular foram determinadas com base na cadeia lateral do resíduo de Asp92 (N.92), o qual está próximo da região central da lobelina. O raio foi fixado em 15 Å, baseado na metade do tamanho da maior molécula utilizada nas simulações computacionais e o número de poses foi definido como 50 para cada ligante. Em seguida, definiu-se a ancoragem no modo rígido de modo a manter as posições espaciais dos resíduos de aminoácidos da estrutura cristalográfica, por tratar-se de um dado experimental (OKADA-JÚNIOR et al, 2018).

Ademais, as moléculas de água foram removidas visto que elas não participam de interações ligante-biomacromolécula nas estruturas cristalográficas, isto é, não foram observadas mediando as interações entre a lobelina e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo do nAChR $\alpha 7$. Os demais ligantes/moléculas de co-cristalização também foram removidos para

os estudos computacionais por meio do programa GOLD. Os átomos de hidrogênio do nAChR em questão foram adicionados automaticamente, pois estes não estão inclusos na estrutura cristalográfica utilizada (OKADA-JÚNIOR et al, 2018).

Os parâmetros para os estudos de ancoragem molecular foram configurados no programa GOLD: **(a)** carregamento do arquivo com extensão .pdb do modelo do biorreceptor (nAChR $\alpha 7$), **(b)** adição dos átomos de hidrogênio ao receptor segundo os parâmetros do programa GOLD, **(c)** remoção das moléculas de água, **(d)** determinação do átomo de referência para a realização da ancoragem, com base na localização da lobelina na estrutura cristalográfica, **(e)** determinação do raio em relação ao átomo de referência (15 Å), **(f)** definição do número de orientações (50 poses) para cada molécula submetida aos estudos de ancoragem molecular, **(g)** determinação da melhor função de pontuação utilizada para a ancoragem, **(h)** carregamento das moléculas previamente desenhadas, com extensão de arquivo *.mol2, seguido de início do cálculo (OKADA-JÚNIOR et al, 2018)..

Na análise dos resultados da redocagem, considerando a orientação espacial da lobelina da própria estrutura cristalográfica, na definição da melhor função de pontuação, foi possível analisar se a orientação espacial e interações com resíduos de aminoácidos-chave se aproximavam das observadas na estrutura cristalográfica. Esta etapa auxilia na escolha da função de pontuação para avaliar as substâncias.

4.1.3 CONSTRUÇÃO DA CLASSE DE SUBSTÂNCIAS DA LITERATURA E DAS SUBSTÂNCIAS PLANEJADAS COMO LIGANTES DE nAChRs $\alpha 7$

Todas as substâncias planejadas foram construídas com o programa MarvinSketch, versão 17.2.27 para obtenção dos estados de protonação em pH fisiológico (pH=7,4). A próxima etapa foi utilizar o programa Discovery Studio Visualizer, (DSV/Version: 17.2.0) a fim de construir os ligantes de interesse, todos com o estado de protonação adequado ao pH fisiológico (pH= 7,4). No caso, os anéis aromáticos foram configurados manualmente (“aromatic”) e os ligantes que apresentaram o grupo nitro (-NO₂) foram

configurados como “partial double”. Em seguida, todas as estruturas foram otimizadas por meio de cálculos de mecânica molecular (MMFF, do inglês, Merck Molecular Force Field), inspeção visual cuidadosa para verificar os ângulos de ligação e protonação do átomo de nitrogênio e salvas com extensão *.mol2. Uma vez construídos e otimizados todos os ligantes, utilizou-se o programa Mercury CSD (v 3.9) como interface gráfica do programa MOPAC 2016 com o intuito de minimizá-los energeticamente por meio do método de cálculo semiempírico PM7, sendo cada estrutura salva com extensão *.mol2 para os posteriores estudos de ancoragem molecular (OKADA-JÚNIOR et al, 2018) (OKADA-JÚNIOR et al, 2018).

4.1.4 VALIDAÇÃO DO MODELO COM LIGANTES DA LITERATURA

Para a validação complementar do modelo obtido, foram selecionados 60 ligantes, de artigos científicos da literatura, com atividade *in vitro* destacada frente aos receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$, os quais foram divididos em três grupos, de acordo com a constante de afinidade (k_i) pelo receptor. Desta forma, eles foram classificados em: 20 moléculas muito ativas ($k_i < 100$ nM), 20 moléculas ativas ou com pouca atividade (100 nM $\leq x \leq 10000$ nM) e 20 moléculas inativas ($k_i > 10000$ nM).

Posteriormente, as estruturas tridimensionais dos ligantes da literatura com afinidade frente aos nAChRs $\alpha 7$ foram construídas e minimizadas (**Seção 4.1.3**). Em seguida, foram realizados estudos de ancoragem molecular de acordo com a metodologia descrita na **Seção 4.1.2**. Esta etapa visa a validação complementar da capacidade preditiva e compreensão de características estruturais relevantes dos receptores nicotínicos de acetilcolina.

4.1.5 ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR ENTRE OS COMPOSTOS PLANEJADOS E O MODELO VALIDADO DO nAChRs $\alpha 7$ (TRIAGEM VIRTUAL)

Após a validação do modelo do receptor de acordo com a **Seção 4.1.2**, os 28 compostos planejados como ligantes de receptores $\alpha 7$ (**ANEXO 2**) foram construídos, minimizados e submetidos à ancoragem no modo rígido de acordo com a metodologia descrita na **Seção 4.1.2**, utilizando a

melhor função de pontuação, a qual foi detectada durante os estudos de validação do modelo obtido. Os cálculos de ancoragem no modo rígido foram feitos para os compostos planejados neste projeto, conforme descrito na **Seção 4.1.2**, seguido da interpretação dos resultados.

Após a ancoragem, todas as poses obtidas para cada molécula foram primeiramente ordenadas com base em valores de pontuação com o programa GOLD. As duas poses geradas com maior valor de pontuação foram analisadas. No caso em que a diferença de valor de pontuação de ambas as poses fosse maior ou igual a 1,00, a pose com maior valor de pontuação seria selecionada, enquanto as poses apresentando valor menor, ambas seriam analisadas com base na orientação e interações ligante-proteína registradas. No caso em que não se observou variação entre as orientações das poses, a de maior valor de pontuação foi selecionada e no caso em que a orientação variou significativamente, ambas foram filtradas com base nas interações observadas para a lobelina co-cristalizada.

As poses de *docking* melhor pontuadas pelo programa GOLD foram analisadas com os programas Discovery Studio (DSV/versão 17.2.0) e o PyMol (v. 2.1). Analisou-se as seguintes interações ligante-proteína: **(1)** hidrofóbica (sigma-Pi, Pi-alquil), **(2)** hidrofóbica (empilhamento-T, empilhamento-Pi), **(3)** hidrofóbica (Pi-S), **(4)** eletrostática (carga negativa-carga positiva), **(5)** cátion-Pi, **(6)** ânion-Pi **(7)** ligação de hidrogênio não clássica (C-H), **(8)** ligação de hidrogênio backbone (espinha-dorsal) e **(9)** ligação de hidrogênio (cadeia lateral) (**ANEXOS 13, 14 e 15**) (OKADA-JÚNIOR et al, 2018).

4.1.6 METODOLOGIAS EMPREGADAS NA REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR (DM)

Em paralelo, iniciaram-se estudos de dinâmica molecular em parceria com o Laboratório de Cristalografia e Química Computacional (LCQC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Faria de Franca. Esse procedimento tem como objetivo otimizar a qualidade da estrutura 5AFN, que possui resolução de 2,15 Å, com o intuito de simular o sistema biológico.

4.1.7 PREPARO DA TOPOLOGIA

Inicialmente, a estrutura cristalográfica do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ (PDB ID: 5AFN), co-cristalizado com a lobelina, foi obtida a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB), do *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB). Em seguida, por meio do programa Swiss PDB Viewer (versão 4.10) foi possível verificar que não havia átomos ou resíduos de aminoácidos faltantes na estrutura cristalina (completa). Em sequência, pode-se utilizar o programa VMD versão 1.9.2 para inspeção visual da estrutura cristalográfica, tendo em vista realizar uma avaliação preliminar da qualidade do modelo obtido, o qual apresentou qualidade adequada para os posteriores estudos de dinâmica molecular. Para tais estudos, portanto, foi empregado o pacote GROMACS (GROningen MAchine for Chemical Simulations) 2016, versão 5.0.6 (PRONK et al, 2013).

A primeira etapa deste processo consiste no preparo dos arquivos de topologia (.top). Nele, estão contidas todas as informações necessárias para definir a molécula dentro de uma simulação. Esta informação inclui parâmetros não vinculados (tipos de átomos e seus respectivos códigos, cargas, nome dos resíduos de aminoácidos, a forma como os átomos estão ligados), bem como parâmetros ligados (ligações, ângulos e diédricos). Utilizou-se então o comando demonstrado no **Anexo 17** para gerar os arquivos de topologia (.top), restrição de posição (.itp) e de campo de força (.gro, contendo o número de átomos do arquivo e suas respectivas coordenadas xyz) para as cinco cadeias do receptor em questão. Ao inserir o comando mencionado, o programa fornece ao usuário uma série de campos de força e configuração das águas, dos quais foram escolhidos o campo OPLSAA e configuração de águas tip4p. Durante esta etapa, verificou-se o não reconhecimento dos co-fatores do receptor $\alpha 7$ pelo GROMACS. Para solucionar tal problema, foi necessário deletar as linhas correspondentes a esses ligantes, presentes no arquivo texto PDB e realizar novamente a etapa supracitada (NAGEL; KRÖNER; RESCH, 2009). O próximo passo foi definir o tamanho da hipercaixa utilizada pelo software GROMACS para os cálculos de dinâmica molecular.

4.1.8 DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA HIPERCAIXA

Para este propósito, pode-se utilizar uma caixa cúbica simples como célula unitária. Nesta técnica, os átomos do sistema foram colocados em uma caixa (normalmente cúbica) e a caixa original foi replicada em todas as direções do espaço. Para tanto, foi possível definir o tamanho da hipercaixa, de modo que a proteína foi inserida e centralizada em um cubo com as dimensões 8,689; 10,00; 12,55 nm (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

4.1.9 SOLVATAÇÃO DA PROTEÍNA

A princípio, a dinâmica molecular foi realizada a vácuo. Em seguida, a etapa de solvatação da proteína foi realizada considerando o sistema solvatado. Neste caso, utilizou-se o comando `gmx solvate -cp 5afn.gro -cs tip4p.gro -o 5afn_solv.gro -p topol.top`, por meio do qual moléculas de água foram inseridas segundo o modelo tip4p dentro da caixa previamente montada. O próximo passo foi equilibrar as cargas do sistema para o mesmo atingir a neutralidade. Para realizar esse passo é necessário saber a quantidade total de íons a serem adicionados observando a carga do sistema no arquivo `topol.top` gerado na etapa anterior. No caso do sistema em questão, a carga total é -9 e para neutralizar o sistema, 9 íons Na^+ foram adicionados (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Inserindo-se o comando `gmx grompp -f ions.mdp -c 5afn_solv.gro -p topol.top -o ion.tpr`, o mesmo atualiza o arquivo `topol.top` para adicionar a posição dos íons e substituir as moléculas de solvente necessárias. O arquivo `ions.mdp` é um arquivo de parâmetros do software GROMACS contendo informações sobre como o sistema deve adicionar esses íons e não foi modificado para esse caso. Em seguida, utilizou-se o comando `gmx genion -s ions.tpr -c 5afn_solv.gro -p topol.top -np 9`, de forma que o arquivo `topol.top` fosse atualizado novamente para adicionar 9 íons Na^+ , sendo que foi requerido ao usuário especificar que o programa deve remover moléculas de solvente (SOL) para acomodá-los. Esse comando é capaz de ler a topologia e substituir as moléculas de água pelos íons que o usuário especifica (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

No comando utilizado, é fornecido o arquivo de entrada (-s), em seguida, gera-se um arquivo .gro como saída (-o), processa-se a topologia (-p) para a remoção de moléculas de água e a adição de íons. Além disso, são definidos os nomes de íons positivos e negativos (-pname e -nname, respectivamente), sendo possível informar ao genion para adicionar apenas os íons necessários para neutralizar a carga líquida na proteína, adicionando o número correto de íons negativos ou positivos (-nn 8) (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

4.2 MINIMIZAÇÃO ENERGÉTICA DA ESTRUTURA

Em seguida, o sistema foi submetido à etapa de minimização de energia usando os algoritmos de máximo declive com restrição de posição (*steepest descent position restrained – stpr*) para os átomos do sistema em questão e o critério de convergência de 1000 kJ.mol⁻¹.nm⁻¹. A minimização de energia, também conhecida como otimização da geometria, é uma técnica que visa encontrar um conjunto de coordenadas, através de um algoritmo genético adequado, buscando eliminar maus contatos entre os átomos e, conseqüentemente, minimizar a energia potencial do sistema de interesse (SANT'ANNA, 2009).

O procedimento consiste em “caminhar” sobre a superfície de potencial na direção em que a energia decresce, de maneira que o sistema é levado a um mínimo de energia local próximo. Através de ajustes nas posições atômicas, o processo relaxa as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de van der Waals. O sistema minimizado possui forças pequenas sobre cada átomo e serve, portanto, como estrutura de partida para iniciar as simulações de DM (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

4.2.1 EQUILIBRAÇÃO DO SISTEMA E DINÂMICA

Na etapa de termalização, o sistema foi submetido a duas simulações de DM, considerando restritas a posições para todo o sistema, exceto para as moléculas de água, temperatura de 308K e pressão de 1 bar. Na primeira simulação, foram considerados constantes o número de partículas, o volume

e a temperatura (conjunto canônico ou *ensemble* NVT). Na segunda etapa, o sistema foi considerado isotérmico-isobárico (temperatura e pressão constantes ou *ensemble* NPT). As simulações de DM descritas anteriormente permitem que os átomos do sistema alcancem velocidades compatíveis com o equilíbrio térmico. Além disso, a restrição da posição dos átomos da proteína permite que as moléculas de água se organizem de forma otimizada ao longo da superfície da proteína, formando, assim, camadas de solvatação mais estruturadas.

No controle da temperatura, utilizou-se o termostato V-rescale (BUSSI, DONADIO; PARRINELLO; 2007) e no controle da pressão, utilizou-se o barostato Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981).

Após a termalização do sistema, simulações de DM foram realizadas durante 10 ns em 5000000 passos.

4.2.2 ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR PARA VALIDAÇÃO (REDOCAGEM) DA ESTRUTURA OTIMIZADA POR DM

A ancoragem molecular foi realizada através do software GOLD Suite (v.5.4), inicialmente ocorrendo a remoção de ligantes de co-cristalização e de águas de hidratação, uma vez que essas moléculas não medeiam interações ligante-receptor na estrutura cristalográfica original. Em seguida, os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura. O centro do raio do sítio ativo foi definido nas coordenadas $x = 38.5534$, $y = -15.7578$ e $z = -1.4681$, tendo como base a cadeia lateral do resíduo de Asp92 (N.92), o qual está próximo da região central da lobelina. O raio escolhido foi de 15 Å, correspondendo à metade do tamanho do maior ligante deste trabalho.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 ANÁLISE DO MODELO *IN SILICO* DO nAChR $\alpha 7$

A estrutura cristalográfica do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) da espécie humana não foi elucidada até o presente momento. No ano de 2015, Spurny e colaboradores elucidaram a estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ quimérico, que compreende a combinação do

nAChR $\alpha 7$ da espécie humana com a espécie de molusco *Aplysia californica* (PDB ID: 2BTN). A estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ quimérico foi utilizada para os estudos de modelagem molecular para a verificação da sua compatibilidade e visando a validação e posterior triagem virtual de novos ligantes. No caso, a estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ quimérico está co-cristalizada com a lobelina (**70**) (PDB ID: 5AFN, resolução 2,15 Å), um fármaco utilizado para o tratamento da dependência química da nicotina (CESTARI, 2013), de doenças respiratórias (MORRIS, 2014) e de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (CESTARI, 2013), entre outros.

Visando avaliar a qualidade da estrutura cristalográfica, foi gerado o gráfico de Ramachandran, com o programa RAMPAGE, para a avaliação do modelo *in silico*. Analisando-se o gráfico, pode-se inferir que ele está dentro dos padrões adequados, apresentando 98,9% de resíduos em regiões permitidas e 1,1% em regiões adicionalmente permitidas, o que indica a presença de apenas 11 resíduos de aminoácidos nas regiões adicionalmente permitidas (“outlier”): A:20=Pro (P), A:24=Asp (D), A:46=Gln (Q), B:24=Asp (D), B:46=Gln(Q), B:159=Ala(A), C:23=Arg(R), D:46=Gln(Q), E:63=Leu(L), que não são resíduos-chave do sítio ativo.

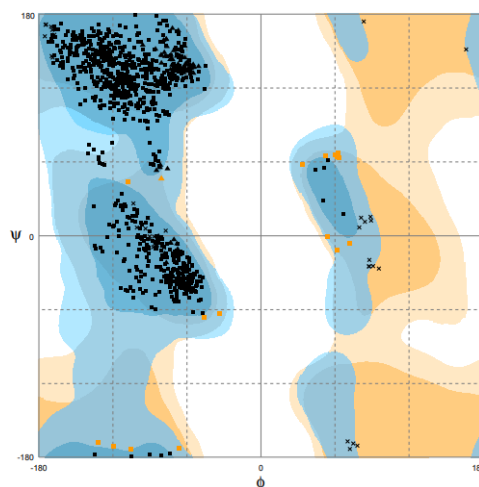


Figura 25: Gráfico de Ramachandran referente à estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ co-cristalizado com a lobelina (**71**).

O gráfico de Ramachandran permite a visualização de todas as combinações possíveis de ângulos diédricos Φ e Ψ nos aminoácidos de um polipeptídeo que contribuem para a conformação da estrutura tridimensional da mesma (secundária). Para cada resíduo em uma proteína, esses ângulos

determinam a conformação do esqueleto da proteína. O ângulo ϕ para determinado resíduo é o ângulo diedro formado por quatro átomos: o carbono do grupo carbonila do resíduo R, e os átomos N, C_{α} e C do resíduo R1. O ângulo ψ é o ângulo diedro formado pelos átomos de N, C_{α} , e C do resíduo R1, e o átomo de N do resíduo R2. Em outras palavras: ϕ define a rotação em torno da ligação C_{α} -N do resíduo, e ψ define a rotação em torno da ligação C_{α} -C do mesmo resíduo (**Figura 26**) (NELSON et al, 2014).

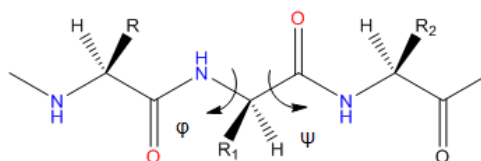


Figura 26: Representação de ângulos diédricos Φ e Ψ de um aminoácido.

Adicionalmente, analisou-se os sítios pertencentes ao nAChR $\alpha 7$ quimérico: sítio ortostérico (sítio ativo), top pocket (bolso superior), vestibule pocket (bolso do vestíbulo) e agonist sub-pocket (subsítio agonista) (JUMA, 2015). Sabendo-se que a lobelina está presente no sítio ativo do receptor, realizou-se uma análise do arquivo PDBsum (PDB ID: 5AFN, **ANEXO 3**) a fim de se verificar quais resíduos de aminoácidos são modulados pela molécula no sítio ortostérico. São eles: Q55, Q114, Y191, W145, C186, S144 e Y184.

Tabela 5: Resíduos de aminoácidos com os quais a lobelina interage.

Sítio ortostérico	Subsítio agonista
Q55	L36
Q114	I165
Y191	Y91
W145	K141
C186	W53
S144	N92
Y184	-

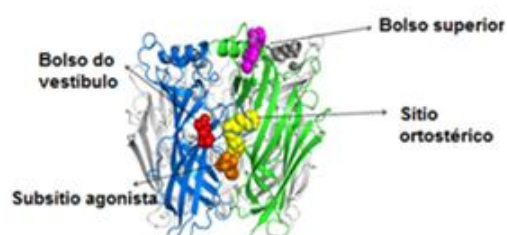


Figura 27: Sítios pertencentes ao nAChR $\alpha 7$ quimérico: sítio ortostérico (amarelo), bolso superior (magenta), bolso do vestíbulo (vermelho), subsítio agonista (laranja) (Adaptado de Spurny et al, 2015).

Também se buscou pela estrutura cristalográfica correspondente ao nAChR $\alpha 7$ quimérico co-cristalizado com a molécula 6-(4-bromofenil)-3-

hidróxi-1,3-dimetil- 2*H*-piridin-4-ona (**72**) (PDB ID: 5AFJ, resolução 2,2 Å, **ANEXO 4**), no subsítio agonista, a qual interage com os resíduos de aminoácidos: L36, I165, Y91, K141, W53 e N92) seguido da busca pela estrutura cristalográfica referente ao nAChR $\alpha 7$ quimérico co-cristalizado com a molécula 4,5-dibromo-*N*-(3-hidróxi-propil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida (**73**) (PDB ID: 5AFM, resolução 2,85Å, **ANEXO 5**), no bolso do vestíbulo. Foi possível observar que esta molécula interage com os resíduos de aminoácidos: L88, Q121, A90, F142, P97 e L100.

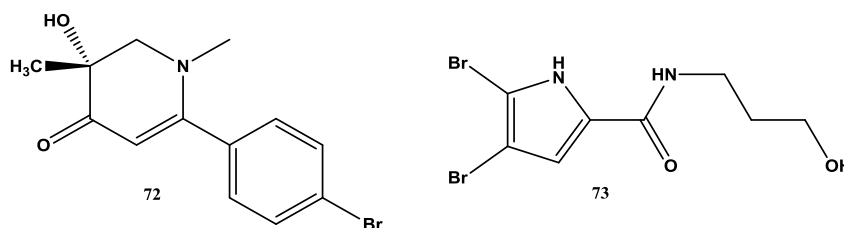


Figura 28: Resíduos de aminoácidos referentes ao nAChR $\alpha 7$ quimérico co-cristalizado com a molécula 6-(4-bromofenil)-3-hidróxi-1,3- dimetil-2*H*-piridin-4-ona (**72**) (PDB ID: 5AFJ), no subsítio agonista e resíduos de aminoácidos referentes ao nAChR $\alpha 7$ quimérico co-cristalizado com a molécula 4,5-dibromo-*N*-(3-hidróxi-propil)-1*H*- pirrol-2-carboxamida (**73**) (PDB ID: 5AFM), no bolso do vestíbulo.

Posteriormente, realizando-se a busca pela sequência FASTA da estrutura cristalográfica de interesse (PDB ID: 5AFN) e pela sequência FASTA do nAChR $\alpha 7$ da espécie humana no sítio proteômico do NCBI, foi possível alinhá-las no programa NCBI-Blast e comparar se os resíduos do sítio ortostérico, subsítio agonista e bolso do vestíbulo estão conservados. Esses resultados estão representados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Comparação entre os resíduos de aminoácidos presentes nas estruturas cristalográficas do nAChR $\alpha 7$ quimérico co-cristalizado com as moléculas **71** (PDB ID: 5AFN, no sítio ortostérico), **72** (PDB ID: 5AFJ, no agonist sub-pocket) e **73** (PDB ID: 5AFM, no vestibule pocket) em relação ao nAChR $\alpha 7$ da espécie humana. **Legenda:** resíduos conservados (preto), resíduos com características físico-químicas semelhantes (azul) e resíduos com características físico-químicas distintas (vermelho).

Sítio ortostérico		Subsítio agonista		Bolso do vestíbulo	
5AFN	nAChR $\alpha 7$ humano	5AFJ	nAChR $\alpha 7$ humano	5AFM	nAChR $\alpha 7$ humano
Q55	Q55	L36	L36	L88	I88
Q114	Q114	I165	I165	Q121	F121
Y191	Y191	Y91	Y91	A90	L90
W145	W145	K141	K141	F142	F142
C186	C186	W53	W53	P97	F97
S144	S144	N92	N92	L100	T100
Y184	Y184	-	-	-	-

Legenda: Q = Gln; Y = Tyr; W = Trp; C = Cys; S = Ser; L = Leu; I = Ile; K = Lys; N = Asn; F = Phe; A = Ala; P = Pro; T = Thr.

Com base nos resultados mostrados na **Tabela 6**, pode-se concluir que os resíduos de aminoácidos contidos nos sítios ortostérico e no subsítio agonista são totalmente conservados no nAChR $\alpha 7$ quimérico e no nAChR $\alpha 7$ da espécie humana, isto é, apresentam 100% de similaridade. Desta forma, os sítios totalmente conservados podem ser usados por apresentarem todos os resíduos da lobelina (PDB sum). Comparando-se os resíduos de aminoácidos do bolso do vestíbulo, pode-se destacar que o único resíduo de aminoácido conservado é a F142. Os resíduos L88 e I88, A90 e L90 referentes ao bolso do vestíbulo são semelhantes quanto às propriedades físico-químicas pela presença de cadeias laterais capazes de realizarem interações hidrofóbicas. Vale ressaltar que diferenças ocorrem no mesmo sítio com os resíduos Q121 e F121, P97 e F97, L100 e T100, os quais diferem quanto às características físico-químicas.

Levando-se em consideração que a lobelina apresenta atividade agonista frente aos nAChRs $\alpha 7$, a estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ quimérico pode ser utilizada para os estudos computacionais.

5.1.1 VALIDAÇÃO DO MODELO *IN SILICO* DO nAChR $\alpha 7$

O modelo *in silico* do nAChR $\alpha 7$ foi validado por meio da redocagem e de estudos de ancoragem molecular no modo rígido envolvendo ligantes da literatura com afinidade *in vitro* para o receptor em questão.

5.1.2 CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES DA LITERATURA COM AFINIDADE FRENTE AO nAChR $\alpha 7$

Inicialmente, 60 ligantes da literatura foram selecionados para validação do modelo *in silico* do nAChR $\alpha 7$ quimérico. O critério de seleção dessas substâncias foi baseado na presença de subunidades aromáticas e subunidades contendo um átomo de nitrogênio básico ou carregado positivamente. Além disso, levou-se em consideração a estereoquímica das substâncias e seus valores de k_i referentes aos nAChRs $\alpha 7$ da espécie humana, sendo classificadas em muito ativas ($k_i < 100$ nM, **ANEXOS 6 e 7**) (BRISTOW et al, 2016; MAZUROV; SPEAKE; YOHANNES, 2011;

MAZUROV et al, 2005; ZANALETI et al, 2012), ativas ou com pouca atividade ($100 \text{ nM} \leq x \leq 10000 \text{ nM}$, **ANEXOS 8, 9 e 10**) (BATISTA; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2016; BEINAT et al, 2015; HURST; ROLLEMA; BERTRAND, 2013; SCRIMPF et al, 2012; ZANALETI et al, 2012) e inativas ($k_i > 10000 \text{ nM}$, **ANEXOS 11 e 12**) (BEINAT et al, 2015; BRIGGS; MCKENNA, 1998; MAZUROV et al, 2005; ONDACHI et al, 2016; SCRIMPF et al, 2012; ZANALETI et al, 2012).

Cada composto foi construído utilizando o programa MarvinSketch, por meio do qual o estado de protonação em $\text{pH}=7,4$ foi determinado, já que o pH fisiológico (normal) do sangue humano deve ficar entre 7,35-7,45 (NELSON, 2014). No Discovery Studio Visualizer, foi realizado cálculo de mecânica molecular (MMFF), a fim de melhorar a qualidade das estruturas construídas. Na mecânica molecular, as moléculas são consideradas como um conjunto de átomos conectados, considerando os ângulos e as distâncias de ligação, associadas ao tipo de hibridização de cada átomo (SANT'ANNA, 2009). Em seguida, cada composto foi submetido à otimização por meio de cálculo semiempírico PM7 com o programa MOPAC 2016, na interface do Mercury. No caso, os principais elementos químicos da Tabela Periódica e de metais de transição são parametrizados com o método de cálculo semiempírico PM7.

5.1.3 ESTUDOS DE REDOCKING PARA VALIDAÇÃO

A fim de escolher a função de pontuação do software GOLD, que melhor prediz as interações observadas na estrutura cristalográfica utilizada neste estudo, realizou-se a redocagem da lobelina na estrutura do receptor, avaliando o RMSD em relação à posição dos átomos do ligante co-cristalizado. As quatro funções de pontuação disponíveis no programa foram utilizadas: **(a)** ChemScore, **(b)** GoldScore, **(c)** ASP e **(d)** ChemPLP.

Cada função de pontuação faz uso de uma série de parâmetros para retornar um valor de pontuação final dos ligantes. A função GoldScore faz uso de quatro parâmetros, dois deles relacionados às interações ligante-receptor (ligações de hidrogênio e interações de van der Waals) e dois relativos à energias internas do ligante (van der Waals e torcionais). A função

ChemScore estima a variação de energia livre total que ocorre no sistema com a interação ligante-proteína (BEINAT et al, 2015; GILLS et al, 2015). A função ASP é uma função de potencial átomo-átomo derivada de um banco de dados de complexos ligante-proteína, sendo que as informações a respeito da frequência das interações entre o ligante e o receptor são obtidas desses complexos e o cálculo se baseia em um estado de referência onde o ligante se encontra livre de interações (ONDACHI et al, 2016). Por fim, a função ChemPLP utiliza uma função de potencial denominada Piecewise Linear Potential para modelar complementariedades estéricas entre o ligante e a proteína, com os termos de ligações metálicas e de hidrogênio dependentes de distância e ângulo, sendo calculados de maneira similar ao que ocorre na função ChemScore e somados ao resultado final (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009).

Os dados obtidos estão relacionados na **Tabela 7**.

Tabela 7: Dados de pontuação e RMSD obtidos através da redocagem da lobelina (71) para as quatro funções de pontuação do programa GOLD.

Função	Pose	Maior pontuação	RMSD da maior pontuação	Pose	Pontuação do menor RMSD	Menor RMSD
ASP	24	50,7638	0,6949	13	49,2755	0,5252
ChemPLP	5	87,1554	0,8859	31	85,5474	0,4143
ChemScore	17	40,7436	2,6831	13	36,4855	0,6372
GoldScore	4	66,1167	1,1405	10	62,2394	0,7862

Dentre as quatro funções de pontuação utilizadas, as funções ChemScore e GoldScore foram ineficazes na predição da pose da lobelina, pois as poses de *docking* melhor pontuadas apresentam RMSD elevado em relação às funções ASP e ChemPLP, sendo incapazes de reproduzir o dado de orientação experimental. A função de pontuação ASP se mostrou adequada para o trabalho, pois a diferença entre sua maior pontuação e a pontuação atribuída à pose classificada com menor RMSD foi menor em comparação com a mesma relação nas funções ChemPLP, ChemScore e GoldScore. Além disso, a diferença entre o RMSD da maior pontuação e o menor RMSD foi menor para a função ASP, mostrando assim que esse método de cálculo é capaz de reproduzir corretamente a orientação espacial da lobelina dentro do sítio ativo do receptor com pequenas variações de pontuação entre a pose com menor RMSD e a pose com melhor pontuação.

Na **Figura 28**, tem-se uma comparação entre a posição de cada átomo do ligante co-cristalizado e do ligante redocado, entre a pose com menor RMSD **(a)** e a pose com melhor pontuação **(b)**, utilizando a função de pontuação ASP.

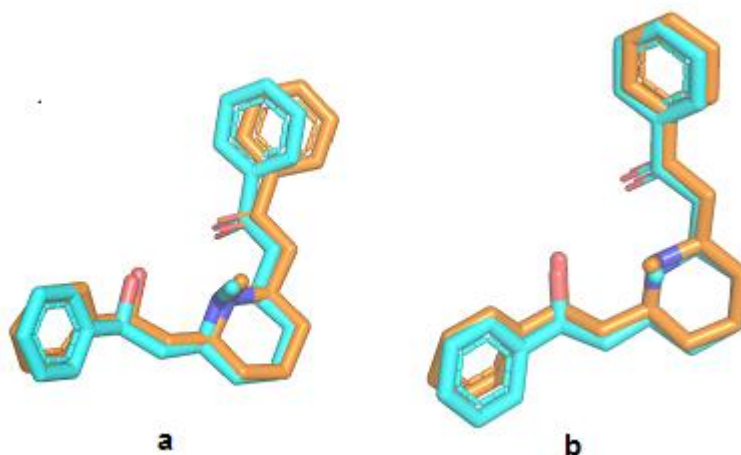


Figura 29: Sobreposição dos átomos de ligantes co-cristalizados e redocados: **a)** entre a pose com menor valor de RMSD (asp, azul) e a lobelina co-cristalizada (cristal, laranja) e **b)** a pose com maior pontuação (asp, azul) e a lobelina co-cristalizada (cristal, laranja).

Conforme se observa na **Figura 28 (a)**, há sobreposição altíssima dos átomos para a pose **13** com menor RMSD em comparação com o ligante **(15)** co-cristalizado na estrutura 5AFN, apesar de apresentar valor de RMSD um pouco superior ao da função ChemPLP como mostrado na **Tabela 7**. Na **Figura 28 (b)**, a pose **24** com melhor pontuação prevista pela função ASP apresentou menor variação na posição espacial dos átomos em relação ao que se observa para o ligante **(71)** co-cristalizado na estrutura 5AFN, pois as subunidades aromáticas não se distanciam significativamente. Quando analisamos o mesmo resultado da função ChemPLP, o RMSD é maior.

Dessa forma, entende-se que o modelo computacional é eficiente em suas previsões para as funções ASP e ChemPLP, mas possui limitações que devem ser avaliadas cuidadosamente para cada ligante. Logo, a função de pontuação ASP foi empregada como base para todos os cálculos de ancoragem molecular subsequentes.

A melhor pose ranqueada para o ligante **71** encontra-se representada na **Figura 30**.

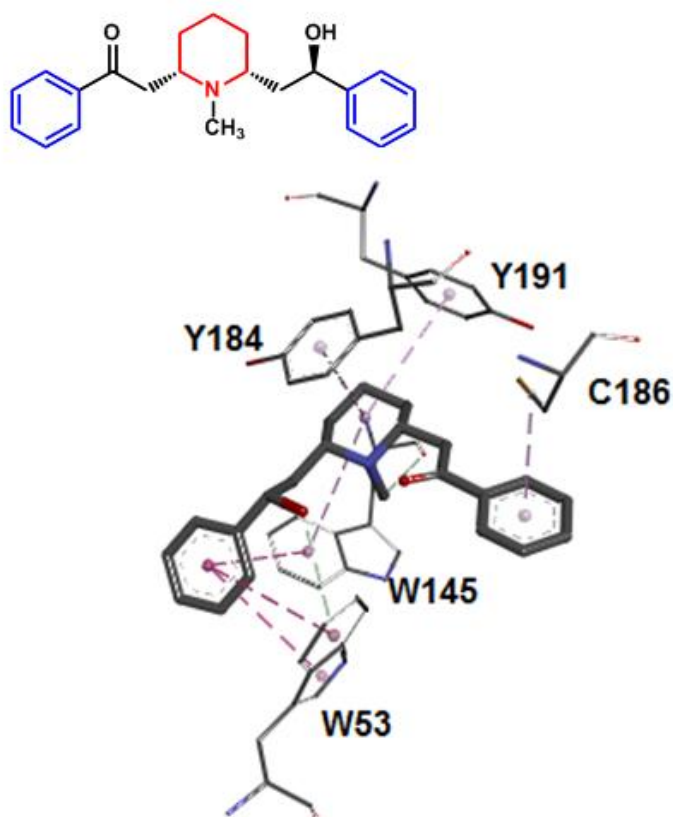


Figura 30: Pose melhor ranqueada pela função de pontuação ASP para o ligante co-cristalizado (**71**).

A função de pontuação ASP prediz a ocorrência de duas ligações de hidrogênio para o ligante **71**. A primeira é uma ligação de hidrogênio não-clássica, acontecendo entre o grupo metila ligado diretamente à subunidade piperidínica do ligante e o átomo de oxigênio da espinha dorsal de W145. A segunda ocorre entre o átomo de oxigênio do ligante e a subunidade indólica (cadeia lateral) do resíduo W53. Além disso, o ligante participa de três interações hidrofóbicas do tipo empilhamento-T. A primeira delas ocorre quando uma das subunidades aromáticas do ligante interage com a subunidade aromática indólica do resíduo W145, enquanto as demais acontecem entre a mesma subunidade aromática do ligante e a subunidade aromática indólica de W53. Adicionalmente, o ligante realiza quatro interações hidrofóbicas do tipo π -alquil. Na primeira, a subunidade cicloexila do ligante interage com a subunidade aromática indólica de W145. Na segunda, ocorre uma interação entre a subunidade cicloexila do ligante e a subunidade aromática fenila de Y184. Na terceira, a subunidade cicloexila do

ligante interage com a subunidade aromática fenila do resíduo Y191. Por fim, uma das subunidades aromáticas do ligante participa de uma interação hidrofóbica do tipo π -alquil com a cadeia lateral de C186.

5.1.4 ANCORAGEM DOS LIGANTES DE nAChRs α 7 DA LITERATURA PARA VALIDAÇÃO COMPLEMENTAR

Os 60 ligantes com valores de constante experimentais de afinidade (K_i) determinadas frente aos nAChRs α 7 foram submetidos à ancoragem molecular no modo rígido, utilizando-se a estrutura cristalográfica quimérica do nAChR α 7. Esta etapa foi realizada com o programa GOLD com a função de pontuação ASP, a qual foi selecionada para avaliação da orientação das melhores poses de *docking*, assim como os resíduos dos nAChRs α 7, envolvidos nas interações com seus respectivos ligantes.

Sendo assim, de acordo com a metodologia descrita na **Seção 4.1.3**, caso as duas poses geradas com maior valor de score tenham orientações distintas, o critério utilizado para selecionar a melhor pose de cada ligante foi baseado na orientação espacial mais próxima da estrutura cristalográfica de interesse e nas interações ligante-proteína com resíduos de aminoácidos-chave. Além disso, verificou-se a porcentagem de ligantes que interagem com os resíduos de aminoácidos-chave dos sítios ortostérico e agonista pertencentes à lobelina (PDBsum: 5AFN): Y91 (36%), **Y184 (76,6%)**, **W145 (88,3%)**, **W53 (73,3%)**, **Y191(65%)**, C186 (41,66%), L36 (50%), S144 (10%), K141 (8,33%), I165 (1,66%) e Q114 (3,33%). Em casos de coincidência no número de interações e na orientação espacial das poses de um mesmo ligante, o critério de desempate para seleção da melhor pose baseou-se no maior valor de pontuação. Vale ressaltar que os resíduos Y184, W145, W53 e Y191 presentes no sítio ativo da lobelina apresentam percentuais elevados, o que confere ao modelo *in silico* a capacidade de prever corretamente as interações-chave entre os resíduos de aminoácidos com os quais a lobelina interage e as moléculas da literatura.

Além disso, foram calculadas separadamente as porcentagens de resíduos-chave presentes nos três grupos de substâncias da literatura: muito ativos: Y91 (45%), **Y184 (65%)**, **W145 (90%)**, **W53 (65%)**, **Y191 (75%)**, C186

(40%), L36 (50%), S144(5%),K141 (15%). Ativas ou com pouca atividade: Y91(35%), **Y184 (70%)**, **W145 (90%)**, **W53 (65%)**, **Y191(45%)**, C186 (45%), L36(45%), S144 (5%), Q114 (10%). Inativos: Y91 (30%), **Y184 (95%)**, **W145 (80%)**, **W53 (90%)**, **Y191 (70%)**, C186 (40%), L36 (55%), S144 (20%), K141 (10%), I165 (5%). Analisando-se as porcentagens de resíduos obtidas para cada grupo de substâncias, foi possível verificar que o modelo computacional não é capaz de diferenciar compostos ativos, muito ativos ou pouco ativos, ou seja, ele não apresenta parâmetros suficientes para realizar essa análise. No entanto, é de extrema relevância considerar o fato de que para os 60 ligantes da literatura (de forma geral), o modelo conseguiu definir que as porcentagens mais elevadas estão relacionadas aos resíduos-chave do sítio ativo. Isso representa, portanto, um dado muito importante para este estudo em questão.

A pose melhor ranqueada para o ligante 5-(4-acetil[1,4]diazepan-1-il) se encontra representada na **Figura 31**.

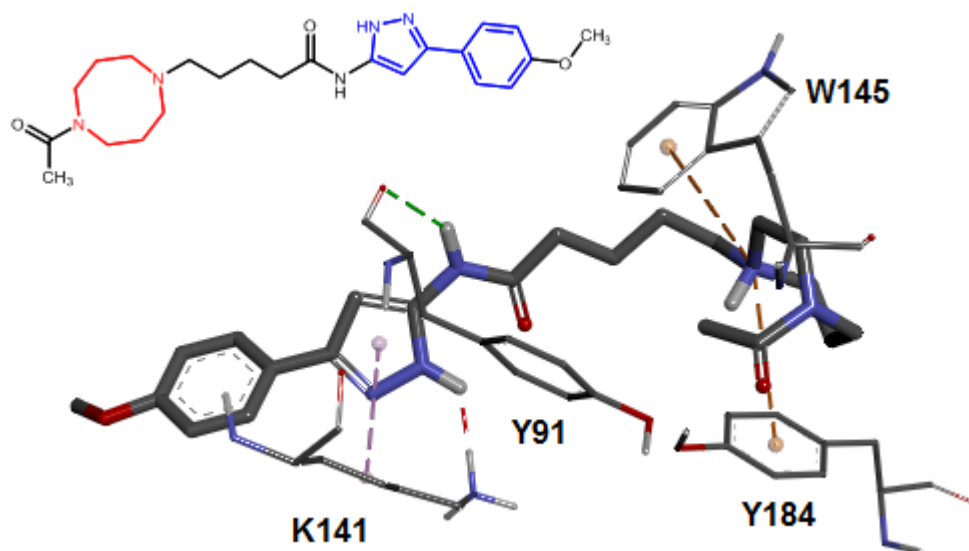


Figura 31: Pose melhor ranqueada pela função de pontuação ASP para o ligante **64** (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza), seguido de sua estrutura bidimensional com seu respectivo valor de *k_i*.

A função de pontuação prediz uma ligação de hidrogênio entre o hidrogênio amídico do ligante e o oxigênio carbonílico da espinha dorsal do resíduo Y91. Pode-se observar que o nitrogênio carregado positivamente

realiza duas interações eletrostáticas do tipo cátion- π , uma com a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) de W145 e outra com a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) de Y184, enquanto a subunidade aromática pirazola do ligante realiza uma interação hidrofóbica do tipo π -alquil com a cadeia lateral do resíduo K141.

5.1.5 TRIAGEM VIRTUAL DOS COMPOSTOS PLANEJADOS EM MODELO *IN SILICO* DOS nAChRs $\alpha 7$

Após a etapa de validação dos modelos dos nAChRs $\alpha 7$, eles foram empregados para a triagem virtual e análise *in silico* dos ligantes do nAChR $\alpha 7$. Para este propósito, os 28 compostos planejados foram previamente construídos, considerando-se o estado de protonação adequado, com o programa MarvinSketch, seguido de cálculo de mecânica molecular com o Discovery Studio Visualizer. Visando melhorar a qualidade das estruturas construídas, cada composto foi submetido à otimização adicional por meio de cálculo semiempírico do tipo PM7 (MOPAC 2016).

Visto que a função de pontuação ASP apresentou o melhor desempenho, esta foi então empregada nos estudos de ancoragem molecular com os compostos planejados. Após a ancoragem, as poses obtidas para cada molécula foram ordenadas com base em valores de pontuação com o programa GOLD e analisadas. Em seguida, as poses de *docking* melhor pontuadas pelo programa GOLD foram analisadas com os programas Discovery Studio e o PyMol, conforme a mesma metodologia descrita na **Seção 4.1.2**.

Dessa forma, os 28 compostos foram analisados com base nos resíduos de aminoácidos-chave envolvidos nas interações ligante-proteína (**Tabela 8**), bem como quanto às suas orientações espaciais em comparação com a estrutura cristalográfica de interesse. No caso, os compostos foram triados priorizando a orientação espacial de cada ligante em relação à lobelina. Em contrapartida, foram observados casos em que os compostos apresentaram maior número de interações com os aminoácidos-chave, porém a orientação espacial variava significativamente em relação à lobelina, o que pode estar associado ao padrão estrutural distinto. Sendo assim, 16

compostos que mais se aproximaram das condições observadas na lobelina foram selecionados, dentre os quais os 8 compostos com maiores valores de pontuação foram eleitos como os mais promissores para a etapa de síntese (Figura 32).

5.1.6 ANÁLISE DOS COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE COM BASE NOS ESTUDOS *IN SILICO*

Os 28 compostos foram analisados com base nos resíduos de aminoácidos-chave envolvidos nas interações ligante-proteína (Tabela 8), bem como quanto as suas orientações espaciais em comparação com a estrutura cristalográfica de interesse.

Tabela 8: Interações previstas para os 8 compostos selecionados para síntese. Resíduos de interesse são destacados em vermelho.

Ligante	ASP	S144	Y91	Y184	C186	C187	W53
15 (5AFN)	50, 7638						
13h	43, 5905						
13e	41, 1896						
13b	41, 0522						
13f	40, 3144						
13g	39, 9044						
13c	38, 7266						
13r	37, 0138						
13q	36, 0272						

Interações:

	Hidrofóbica (Pi-alkil, sigma-Pi)		Ligação de Hidrogênio não-clássica
	Empilhamento-T		Ligação de Halogênio
	Empilhamento-Pi		Ligação de Hidrogênio backbone
	Eletrostática (cátion-Pi)		Ligação de Hidrogênio sidechain
			Ligação de Hidrogênio (Pi-par isolado)

Verificou-se a porcentagem dos 8 melhores compostos planejados que interagem com os resíduos de aminoácidos-chave dos sítios ortostérico e agonista do nAChRs $\alpha 7$: Y91 (35,71%), Y184 (89,28%), W145 (85,71%), W53 (75%), Y191 (92,85%), C186 (25%), e S144 (25%).

Conforme pode ser observado na Figura 32, quatro dos 8 compostos selecionados como candidatos a ligantes de nAChRs $\alpha 7$ apresentam os grupos trifluormetila ou trifluormetoxila em suas estruturas químicas. Levando-se em consideração que após a etapa de síntese estão previstos

ensaios farmacológicos *in vitro* a fim de avaliar a afinidade (K_i) dos compostos pelo *nAChR* do subtipo $\alpha 7$ e propriedades farmacológicas e funcionais dos derivados planejados, pode-se analisar criticamente o efeito da presença dos grupo trifluormetila ou trifluormetoxila nesses 8 compostos. Devido à sua forte eletronegatividade, o flúor é capaz de interferir significativamente no pK_a e na densidade eletrônica de anéis aromáticos e heteroaromáticos presente nos quatro compostos (GILLS et al, 2015). O pK_a de um centro ionizável em uma molécula modifica o perfil de lipofilicidade que, conseqüentemente, influencia a solubilidade e a permeabilidade. Alterações no pK_a podem se manifestar como mudanças na potência, seletividade, propriedades farmacocinéticas (PK) incluindo absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) (GILLS et al, 2015).

O flúor como substituto direto de um átomo de hidrogênio (por exemplo, $Ar - H \rightarrow Ar - F$, $CH_3 \rightarrow CF_3$) pode aumentar a potência e a seletividade, afetando o pK_a , a conformação, interações hidrofóbicas e lipofilicidade das substâncias supracitadas. Além disso, o flúor pode reduzir o metabolismo pelo fato de estar ligado em um grupo aromático, que é propenso a oxidação (por exemplo, anéis fenílicos ricos em elétrons) (GILLS et al, 2015). Adicionalmente, o flúor é frequentemente utilizado para influenciar a permeabilidade de determinada substância por meio da modulação da lipofilicidade, associada aos doadores de ligação de hidrogênio ou redução da basicidade da amina, interferindo nos valores de $\log P$, uma medida comum de lipofilicidade (GILLS et al, 2015).

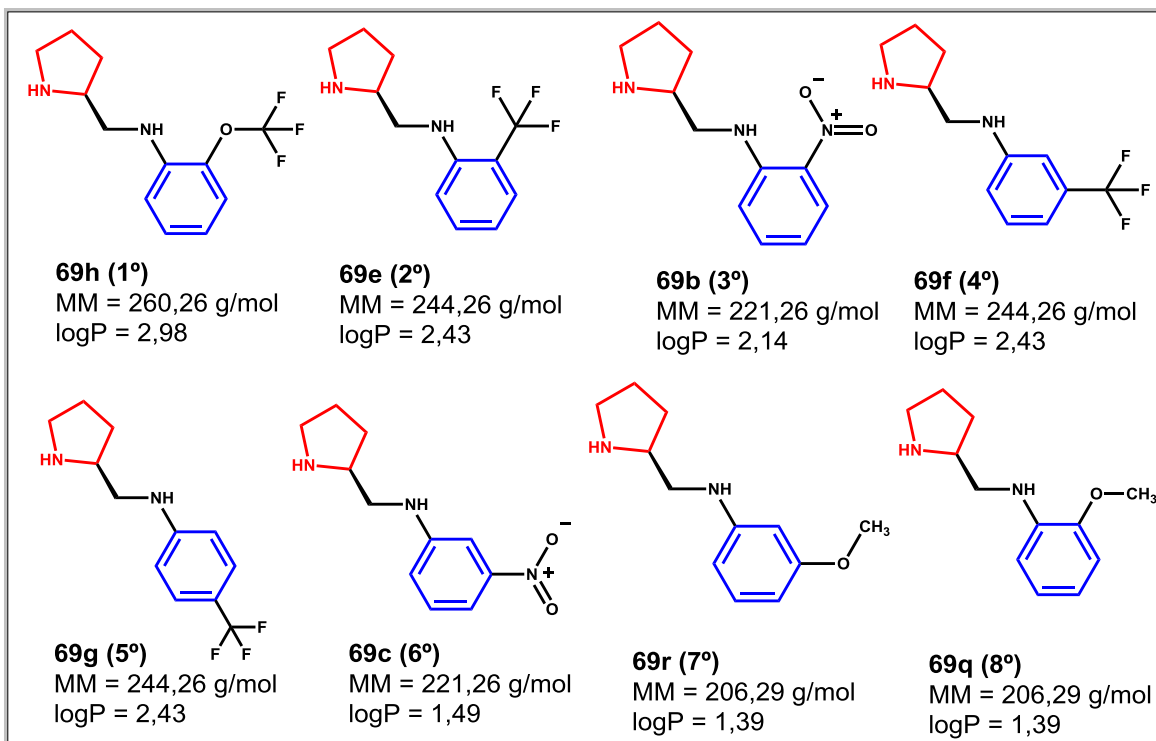


Figura 32: Compostos de padrão pirrolidínico selecionados com base nos estudos *in silico*, como candidatos a ligantes agonistas de nAChRs $\alpha 7$.

A seguir, podemos observar os tipos de interações presentes entre o ligante co-cristalizado e a proteína ligante de acetilcolina (AChPB) homóloga proveniente da espécie *Aplysia californica* (**Figura 32**).

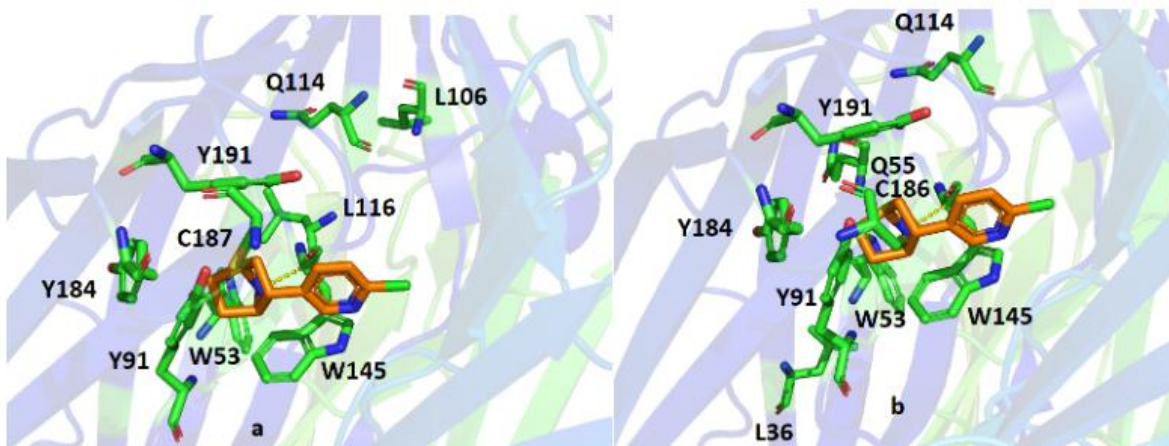


Figura 33: Comparação entre a orientação espacial do (a) ligante 115 (ANEXO 11) co-cristalizado na AChPB da espécie *Aplysia californica* (3SQ6) (LI et al, 2011) e (b) ancorado no nAChRs $\alpha 7$, respectivamente. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Linhas tracejadas em amarelo representam átomos envolvidos em ligações de hidrogênio.

Em análise complementar, sabendo-se que o ligante 2'-fluor (carbamoilpiridinil)descloroepibatidina (**115**) está co-cristalizado com a AChBP a espécie *Aplysia californica*, realizou-se uma busca no sítioPDBsum(PDB ID:3SQ6, **ANEXO 16**) a fim de se verificar quais resíduos de aminoácidos são modulados pela molécula no sítio ortostérico. De acordo com os dados do PDBsum, os resíduos de interesse Q114, Y191, Y184, Y91, W53 e W145 estão no nAChRs $\alpha 7$ e estão conservados na mesma posição espacial na estrutura 3SQ6, enquanto os resíduos C186 e L36 estão substituídos por resíduos similares, que ocupam posições espaciais diferentes, correspondendo aos resíduos C187, L106 e L116 da proteína homóloga. Dessa forma, entende-se que a estrutura homóloga é adequada para a ancoragem comparativa, uma vez que 6 de 9 resíduos de interesse encontram-se espacialmente conservados ou substituídos por resíduos de efeitos eletrônicos semelhantes.

Para **115** ancorada no sítio ortostérico da AChPB da espécie *Aplysia californica*, as interações previstas pela função de pontuação ASP são as seguintes: o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio bicíclico realiza ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio da espinha dorsal do W145. O átomo de cloro do ligante realiza interação de halogênio com o átomo de oxigênio da espinha dorsal da Q114. A subunidade aromática do ligante interage com a cadeia lateral de L116 e ainda interage com a subunidade aromática indólica (cadeia lateral) de W145 por meio de uma interação hidrofóbica do tipo empilhamento-T. O átomo de cloro do ligante realiza duas interações hidrofóbicas com as cadeias laterais de L106 e L116. Por fim, a subunidade aromática fenila interage com a cadeia lateral de C187 e com a cadeia lateral de L106 por meio de uma interação hidrofóbica do tipo π -alquil.

A melhor pose ranqueada para o melhor ligante planejado **69h** se encontra representada na **Figura 34**.

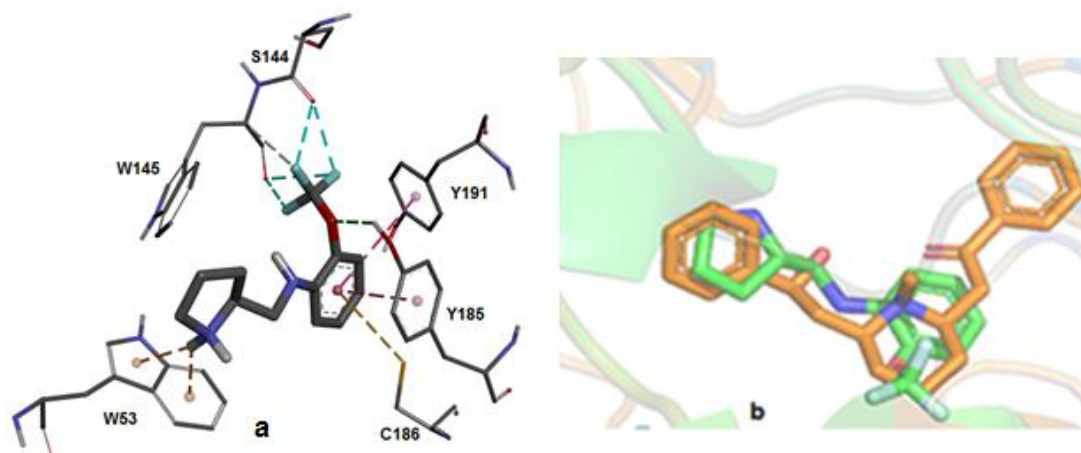


Figura 34: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação ASP para o ligante **69h** (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante **69h** (verde).

A função de pontuação ASP no modelo *in silico* do receptor $\alpha 7$ prediz uma ligação de hidrogênio para o complexo mostrado na **Figura 34**. Ela ocorre entre o oxigênio ligado diretamente à subunidade aromática do ligante e a hidroxila da cadeia lateral do resíduo Y184. Além disso, um dos átomos de flúor faz interação de halogênio com o oxigênio da espinha dorsal de W145. O modelo prevê também que dois átomos de flúor do ligante se encontram em uma posição favorável a duas ligações de halogênio com o oxigênio carbonílico da espinha dorsal da S144 e duas ligações de halogênio envolvendo o oxigênio da espinha dorsal de W145. Pode-se observar que o átomo de hidrogênio pirrolidínico do ligante realiza duas interações eletrostáticas do tipo cátion- π com as subunidades aromáticas (cadeia lateral) do resíduo W145. Adicionalmente, a subunidade aromática do ligante participa de uma interação do tipo π -S com a cadeia lateral do resíduo C186. Pode-se observar ainda que a mesma subunidade realiza interação hidrofóbica do tipo empilhamento- π com a subunidade aromática da fenila (cadeia lateral) de Y191 e do tipo empilhamento-T com a subunidade aromática da fenila (cadeia lateral) de Y184.

Para o ligante **69e**, a melhor pose ranqueada se encontra representada na **Figura 35**.

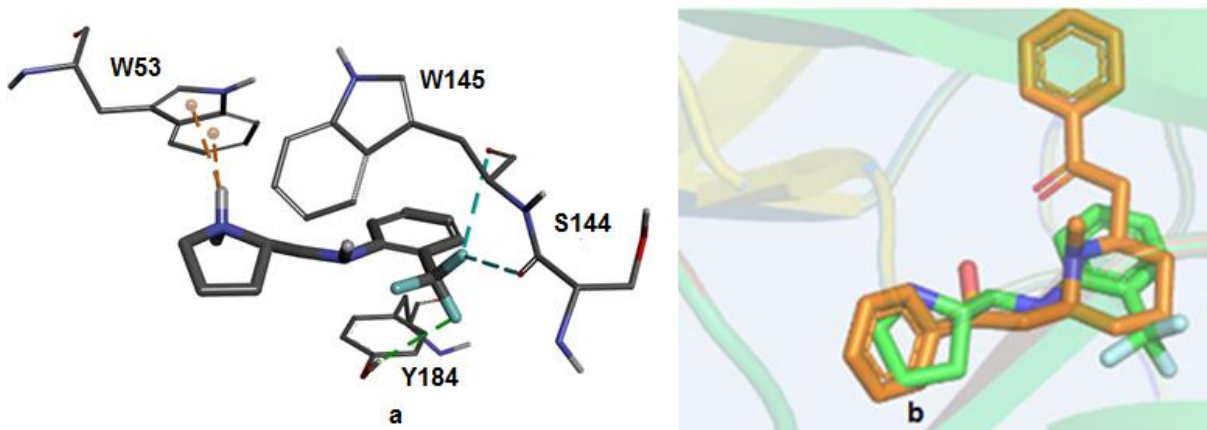


Figura 35: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante **69e** (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante **69e** (verde).

O modelo computacional prevê uma ligação de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio, presente na cadeia lateral do resíduo Y184, e um dos átomos de flúor do ligante. Os outros dois átomos de flúor do ligante realizam duas interações de halogênio, interagindo com os oxigênios carbonílicos da espinha dorsal dos resíduos S144 e W145. O hidrogênio ligado diretamente ao átomo de nitrogênio carregado positivamente, pertencente à subunidade pirrolidínica do ligante, realiza duas interações eletrostáticas do tipo cátion- π com a subunidade aromática indólica (cadeia lateral) do resíduo W53.

A melhor pose ranqueada para o ligante **69b** se encontra representada na **Figura 36**.

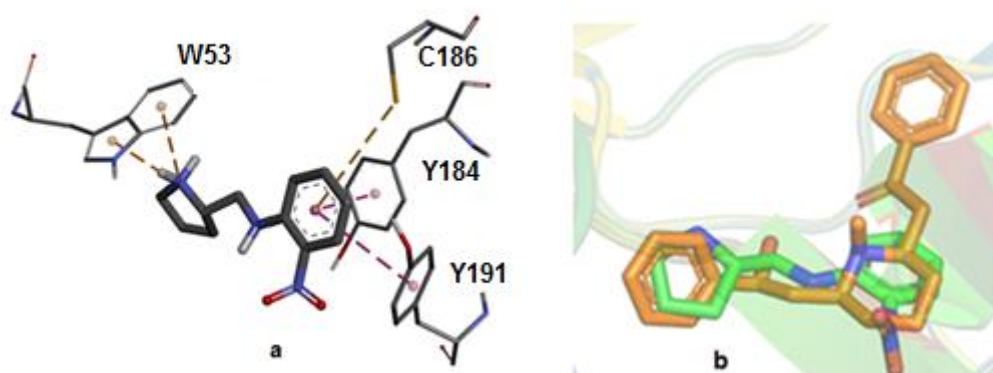


Figura 36: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante **69b** (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, verde) e do ligante **69b** (laranja).

Segundo o modelo computacional, o ligante participa de uma ligação de hidrogênio envolvendo um dos átomos de oxigênio pertencente ao grupo nitro ($-\text{NO}_2$) com a hidroxila da cadeia lateral do resíduo Y184. O nitrogênio carregado positivamente da subunidade pirrolidínica do ligante e um dos átomos de hidrogênio diretamente ligado ao nitrogênio da mesma subunidade participam de duas interações eletrostáticas do tipo cátion- π com a cadeia lateral do resíduo W53. O sistema aromático do ligante interage com a cadeia lateral do resíduo C186 por meio de uma interação hidrofóbica do tipo π -S. O sistema aromático do ligante também participa de interações hidrofóbicas do tipo empilhamento- π com a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) de Y191 e do tipo empilhamento-T com a subunidade aromática (cadeia lateral) de Y184.

A melhor pose ranqueada para o ligante **69f** se encontra representada na **Figura 37**.

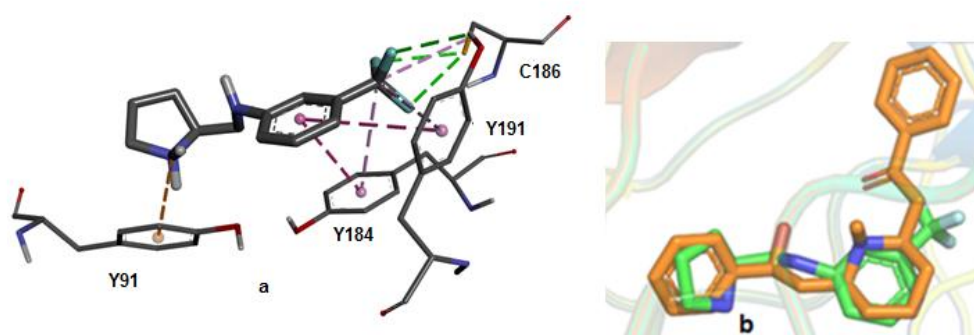


Figura 37: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante **69f** (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante **69f** (verde).

De acordo com a função de pontuação ASP, o ligante se encontra posicionado favoravelmente para que ocorra uma ligação de hidrogênio envolvendo um dos átomos de flúor do ligante e o hidrogênio da hidroxila da cadeia lateral da Y191. A subunidade aromática do ligante realiza interação hidrofóbica do tipo empilhamento- π com a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) do resíduo Y184 e ainda participa de uma interação hidrofóbica do tipo empilhamento-T com a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) de Y191. O nitrogênio, carregado positivamente, pertencente à subunidade pirrolidínica do ligante realiza interação eletrostática do tipo

cátion- π com a subunidade aromática (cadeia lateral) do resíduo Y91. O átomo de carbono do grupo trifluormetila do ligante participa de interação hidrofóbica do tipo alquil com a cadeia lateral do resíduo C186. Por fim, o mesmo átomo de carbono do ligante participa de duas interações hidrofóbicas do tipo π -alquil, uma delas envolvendo a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) de Y184 e outra envolvendo a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) de Y191.

A melhor pose ranqueada para o ligante **69g** se encontra representada na **Figura 38**.

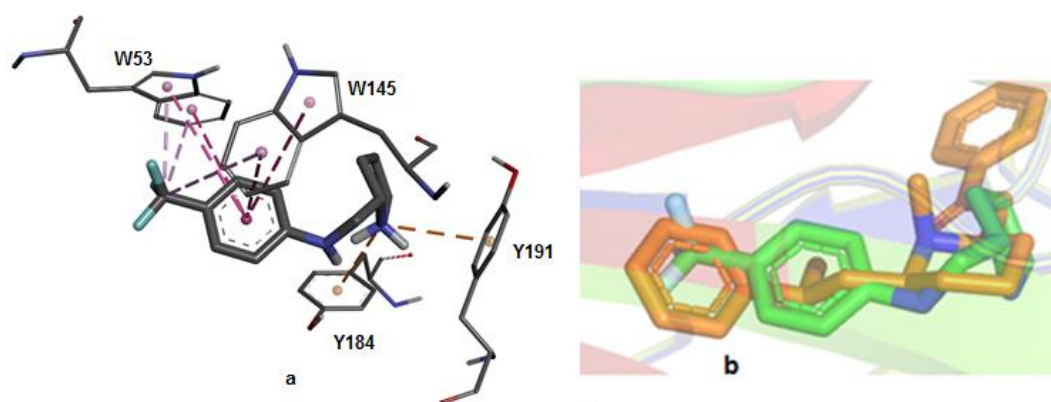


Figura 38: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante **69g** (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante **69g** (verde).

De acordo com a função de pontuação ASP, o nitrogênio pertencente à subunidade pirrolidínica, carregado positivamente, participa de duas interações eletrostáticas do tipo cátion- π , uma delas envolvendo a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) do resíduo Y184 e outra envolvendo a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) do resíduo Y191. A subunidade aromática do ligante participa de duas interações hidrofóbicas do tipo empilhamento- π com a subunidade aromática indólica do resíduo W145 e de duas interações hidrofóbicas do tipo empilhamento-T com a subunidade aromática indólica do resíduo W53. Além disso, o átomo de carbono do grupo trifluormetila do ligante interage com a subunidade aromática indólica de W145 por meio de uma interação hidrofóbica do tipo π -alquil e ainda interage com a subunidade aromática indólica do resíduo W53 por meio de duas interações hidrofóbicas do tipo π -alquil.

A melhor pose ranqueada para o ligante **69c** se encontra representada na **Figura 39**.

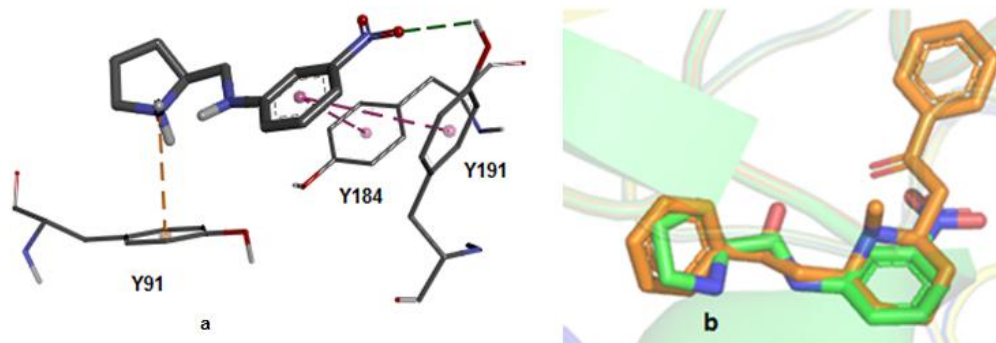


Figura 39: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante **69c** (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante **69c** (verde).

Na **Figura 39**, é mostrada a melhor pose de *docking* obtida com a função de pontuação ASP para o ligante **69c**. Pode-se observar que um dos átomos de oxigênio pertencente ao grupo nitro (NO_2) do ligante se encontra em uma posição favorável à uma ligação de hidrogênio com a hidroxila da cadeia lateral de Y191. O nitrogênio do ligante, carregado positivamente, participa de interação eletrostática do tipo cátion- π com a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) do resíduo Y91. O modelo prediz também a ocorrência de empilhamento-T entre a subunidade aromática do ligante e a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) do resíduo Y191 e de empilhamento- π com a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) de Y184.

A melhor pose ranqueada para o ligante **69r** se encontra representada na **Figura 40**.

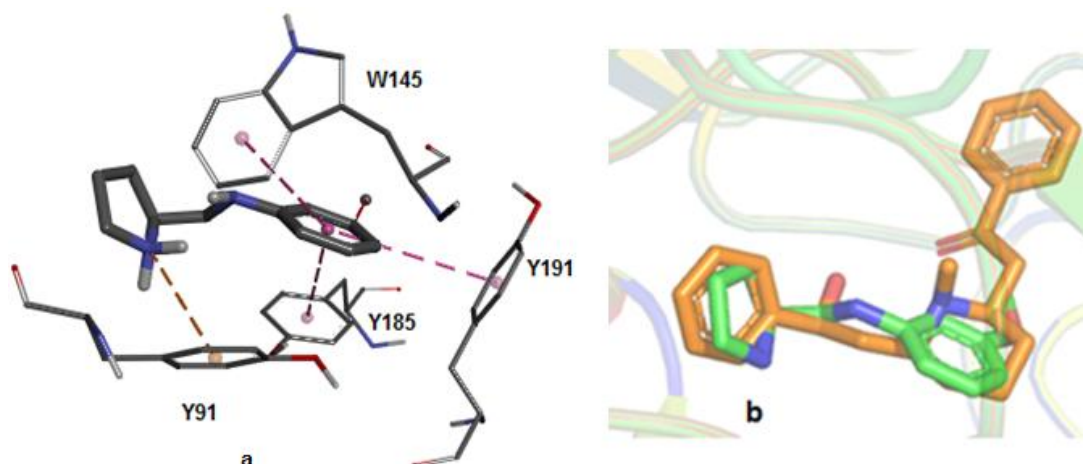


Figura 40: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante **69r** (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante **69r** (verde).

Para o complexo mostrado na **Figura 40**, a função ASP prediz a ocorrência de uma interação eletrostática do tipo cátion- π envolvendo o nitrogênio carregado positivamente da subunidade pirrolidínica do ligante com a subunidade aromática (cadeia lateral) do resíduo Y91. Observa-se também a ocorrência de uma interação hidrofóbica do tipo empilhamento- π entre a subunidade aromática do ligante e a subunidade aromática (cadeia lateral) do resíduo Y184. Além disso, uma interação hidrofóbica do tipo empilhamento-T ocorre entre a subunidade aromática do ligante e a subunidade aromática indólica (cadeia lateral) de W145 e uma interação hidrofóbica do tipo empilhamento-T ocorre entre a subunidade aromática do ligante e a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) Y191.

A melhor pose ranqueada para o ligante **69q** seencontra representada na **Figura 41**.

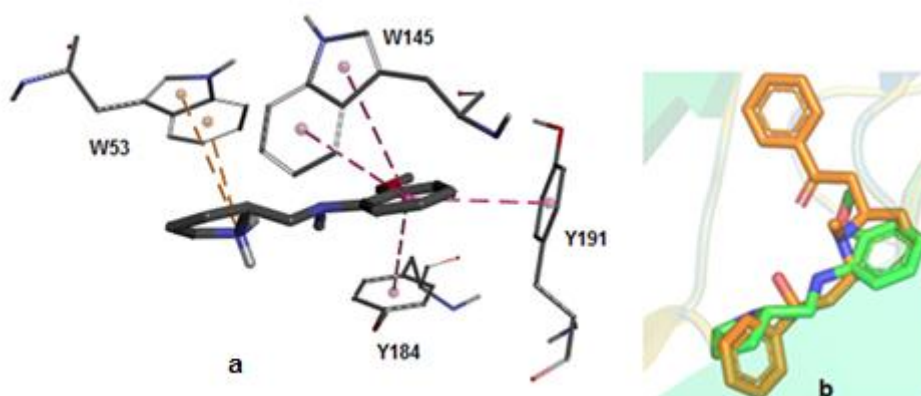


Figura 41: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação para o ligante **69q** (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição espacial dos átomos do ligante co-cristalizado (lobelina, laranja) e do ligante **69q** (verde).

De acordo com a função de pontuação ASP, o ligante se encontra posicionado favoravelmente para que ocorram duas interações cátion- π envolvendo o nitrogênio da subunidade pirrolidínica carregado positivamente. A primeira e a segunda ocorrem entre o nitrogênio mencionado e a subunidade aromática indólica do resíduo W53. A função ASP também estima que o ligante participa de três interações hidrofóbicas do tipo empilhamento-T. A primeira e a segunda ocorrem entre a subunidade aromática do ligante e a subunidade aromática indólica (cadeia lateral) do resíduo W145. A terceira ocorre entre a subunidade aromática do ligante e a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) do resíduo Y191. Por fim, ocorre uma interação hidrofóbica do tipo empilhamento- π entre a subunidade aromática fenila do ligante e a subunidade aromática fenila (cadeia lateral) de Y184.

A sobreposição dos oito compostos selecionados para a etapa de síntese, descritos na **Figura 32**, estão representados na **Figura 42**.

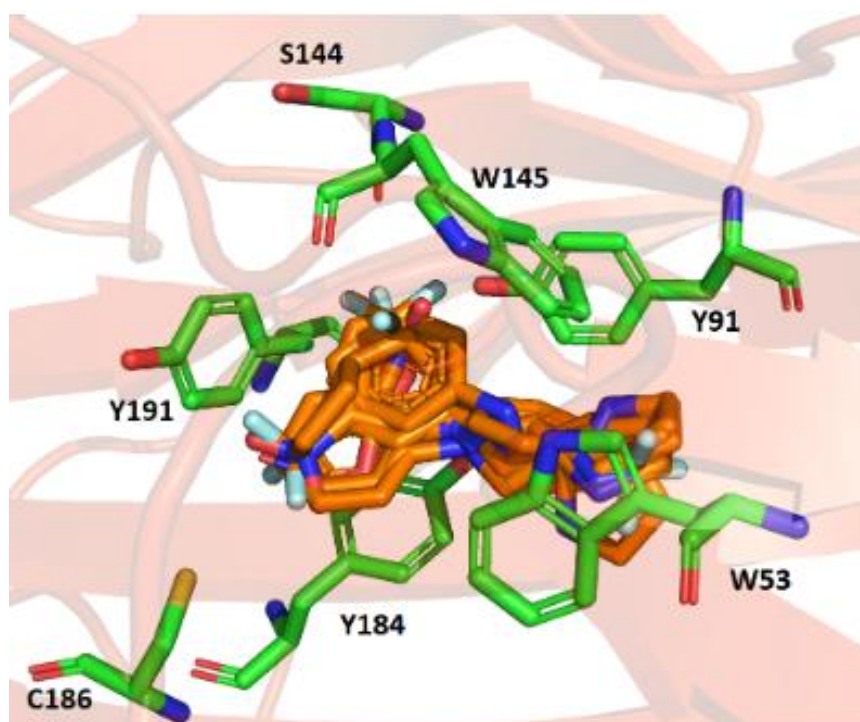


Figura 42: Sobreposição das poses melhor ranqueadas para os 8 fragmentos moleculares triados para a etapa de síntese. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.

A **Figura 42** apresenta boa sobreposição entre as poses previstas

para os 8 ligantes. Nota-se que os fragmentos *o*-substituídos e *m*-substituídos se orientam na direção de Y184 e Y191. Os compostos se orientam de modo a posicionar a região aromática entre as cadeias laterais dos resíduos Y184, Y191, Y91, bem como entre as cadeias laterais dos resíduos da cavidade aromática, W145 e W53. O nitrogênio carregado positivamente, pertencente à subunidade pirrolidínica do ligante se encontra em uma região onde é possível que participem de interações eletrostáticas do tipo cátion- π com Y91 e W53.

5.1.7 ANÁLISE DO MODELO DO nAChR $\alpha 7$ OBTIDO POR DINÂMICA MOLECULAR (DM)

Visto que a estrutura do nAChR $\alpha 7$ tem resolução de 2,15 Å, foi decidido otimizar sua qualidade para estudos computacionais futuros. Por essa razão, a dinâmica molecular foi aplicada. Com o intuito de se avaliar a qualidade da estrutura cristalográfica após estudos de dinâmica molecular, foi gerado o gráfico de Ramachandran (**Figura 43**).

Pode-se inferir que ele está dentro dos padrões adequados, pois apresenta 98,9% dos resíduos em regiões permitidas e 1,1% em regiões não-permitidas, indicando a presença de apenas 11 resíduos de aminoácidos nas regiões adicionalmente permitidas ("outlier"): A: 67=Val (V), A: 162=Ser (S), C: 24=Asp (D), D: 7=Tyr (Y), D: 46=Gln (Q), D: 128=Ser (S), E: 13=Asn (N), E: 19=Ile (I), E: 46=Gln (Q), E: 149=Ser (S) e D: 186=Cys (C), o qual é considerado um resíduo-chave do sítio ativo, de acordo com a análise do modelo *in silico* do nAChR $\alpha 7$.

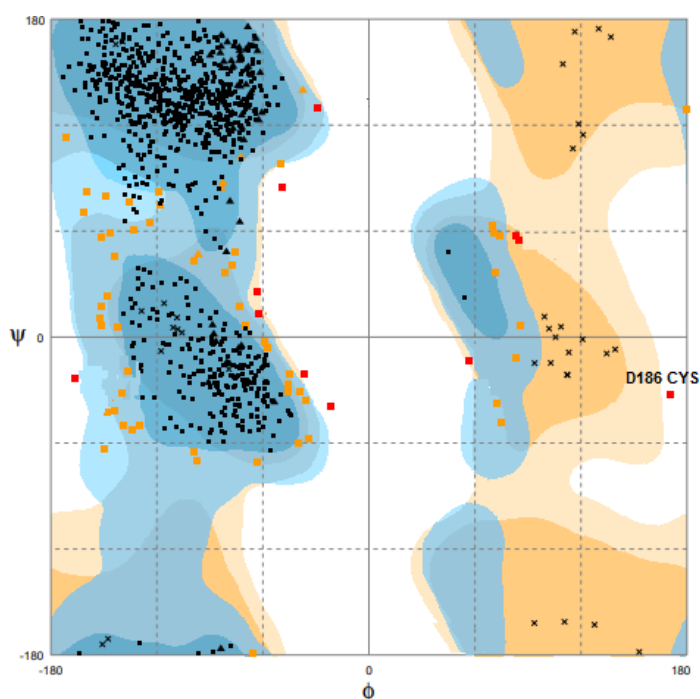


Figura 43: Gráfico de Ramachandran referente à estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ obtida por dinâmica molecular.

5.1.8 AVALIAÇÃO DO RMSD DO MODELO DO nAChR $\alpha 7$ OBTIDO POR DM

RMSD, do inglês “Root Mean Square Deviation”, é a Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio, ou seja, é o valor médio para o desvio médio dos átomos em relação a uma estrutura de referência. Este valor é relevante nos estudos de dinâmica molecular quando se pretende avaliar a equilibração e estabilidade do sistema em estudo. Portanto, é de extrema importância avaliar a diferença estrutural entre duas moléculas, antes e depois da DM. Quanto maior o valor de RMSD, maior é a diferença estrutural entre as proteínas ou estruturas que estão a ser alvo de comparação (SARGSYAN; GRAUFFEL; LIM, 2017). No caso, pode-se avaliar a oscilação do sistema durante o tempo decorrido da dinâmica. Mudanças bruscas de RMSD denotam mudanças conformacionais importantes na molécula, enquanto pequenas oscilações de RMSD indicam equilíbrio do sistema (CARUGO, 2003). Neste estudo, baixos valores de RMSD foram observados durante todo o tempo de simulação (**Figura 44**), indicando alta estabilidade da molécula no sistema.

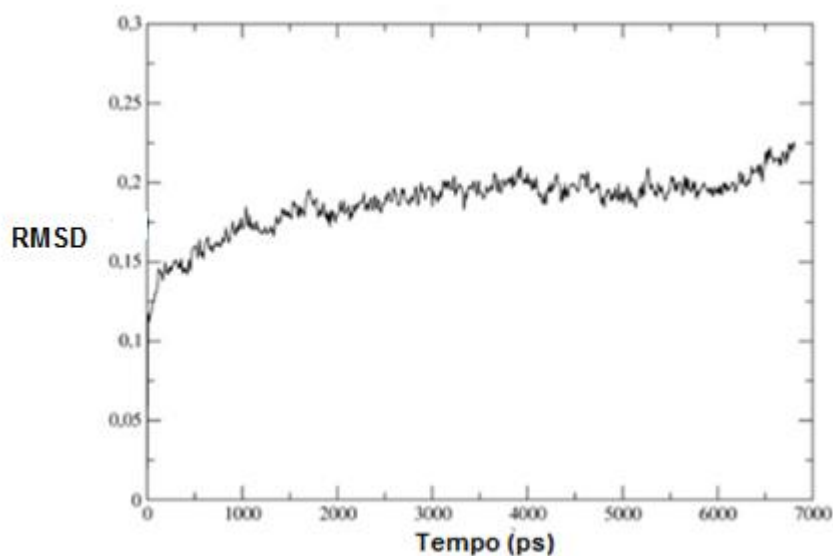


Figura 44: Avaliação do RMSD do nAChR $\alpha 7$ em função do tempo.

5.1.9 ENERGIA POTENCIAL

Com base nos resultados obtidos pelos estudos de Dinâmica Molecular, foi possível analisar cuidadosamente o sistema. Foi possível obter a energia total do sistema e se analisou então a energia total do sistema. Por meio desta análise e sabendo-se que a energia potencial é uma função das posições de todas as partículas do sistema, pode-se constatar a ocorrência de decréscimo de energia total do sistema, ou seja, o sistema foi levado a um mínimo de energia. Sendo assim, o gráfico da energia potencial em função do tempo evidenciou alta estabilidade do sistema em água, a 298K, pois (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

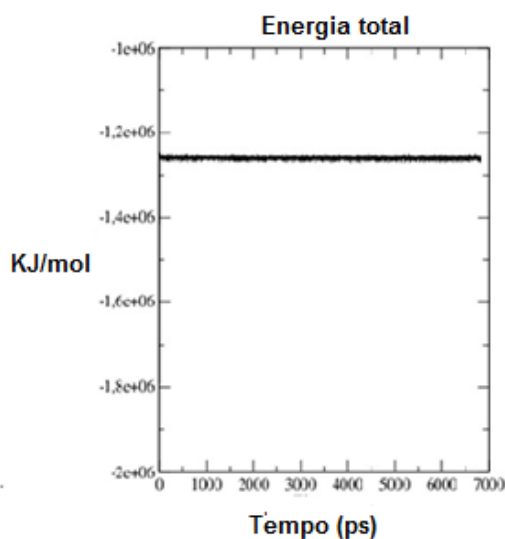


Figura 45: Gráfico referente à energia total do sistema.

5.2 INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA X INTERAÇÃO PROTEÍNA-SOLVENTE

Analisando-se as ligações de hidrogênio observadas na interação proteína-proteína (**Figura 46**), verifica-se a ocorrência de oscilação no aumento e na diminuição de ligações de hidrogênio (LIMA, 2015).

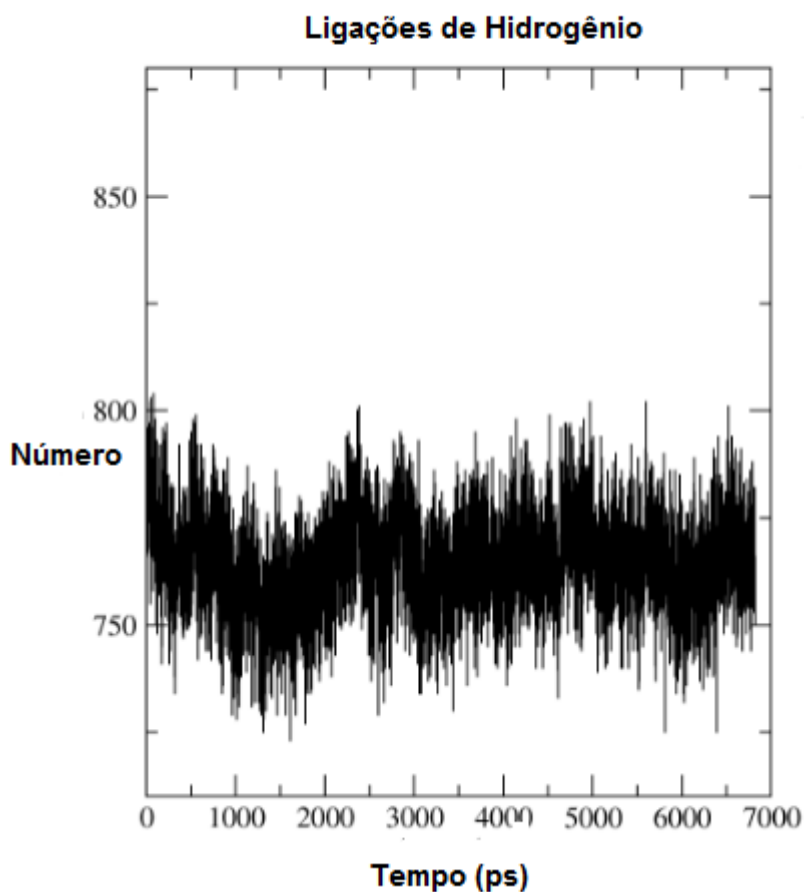


Figura 46: Representação de ligações de hidrogênio presentes nas interações proteína-proteína.

Além disso, foram observados os efeitos da presença de ligações de hidrogênio na interação proteína-solvente (**Figura 46**), indicando que a proteína deixa de interagir consigo mesma para interagir com o solvente. Isso acontece porque as ligações de hidrogênio são fundamentais na determinação e na estabilização estrutural das proteínas, sendo também importantes no reconhecimento molecular e nos mecanismos de reações enzimáticas (LIMA, 2015).

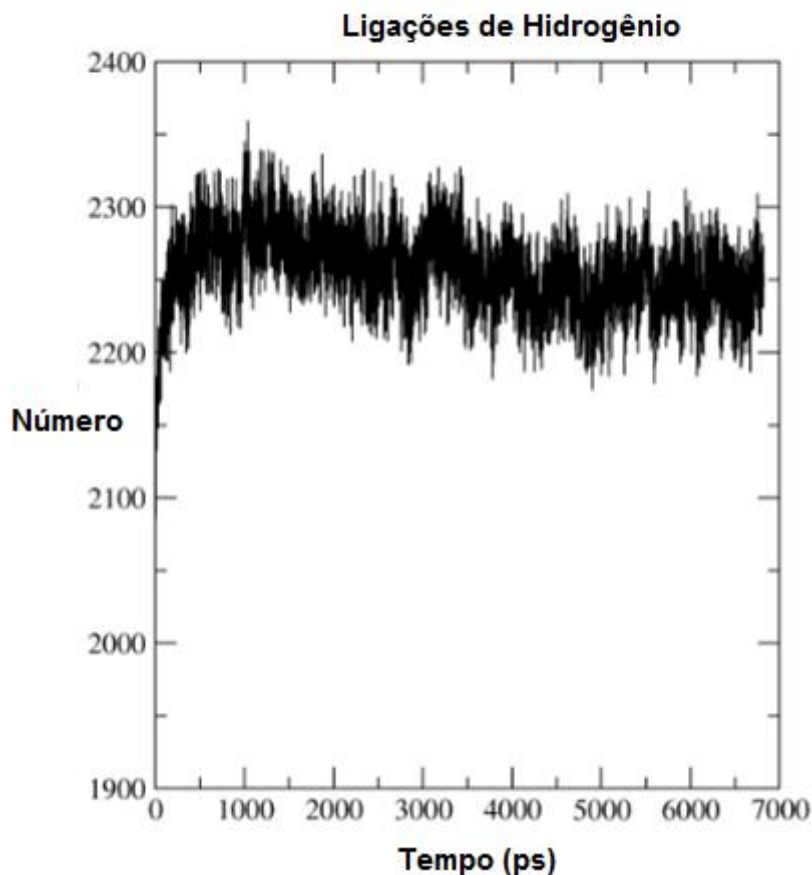


Figura 47: Representação de ligações de hidrogênio presentes nas interações proteína-solvente.

5.2.1 HELICIDADE POR RESÍDUO

Através de cálculos de dinâmica molecular, determinou-se a helicidade do sistema em função do tempo. A periodicidade da hélice indica a repetição da cadeia e também dita o mecanismo de abertura e fechamento de determinado canal iônico. Isto é, a presença de um fármaco no canal iônico é capaz de manter conformação da hélice fechada, ao passo que a ausência de fármaco no canal pode propiciar a formação de uma quantidade maior de hélices no sistema. Foi possível observar um histograma de resíduos de aminoácidos pertencentes à proteína de interesse. Para tanto, o gráfico obtido (**Figura 48**) demonstra as posições das hélices ao longo da estrutura no sistema. Como o sistema de interesse é pentâmero, cinco picos intensos que aparecem no gráfico correspondem a cinco hélices da proteína. Sabendo-se que as ligações de hidrogênio presentes no solvente (água) são extremamente importantes na determinação e na estabilização estrutural das

proteínas, a água estabiliza a proteína aumentando, portanto, o número de hélices dentro do sistema (LIMA, 2015).

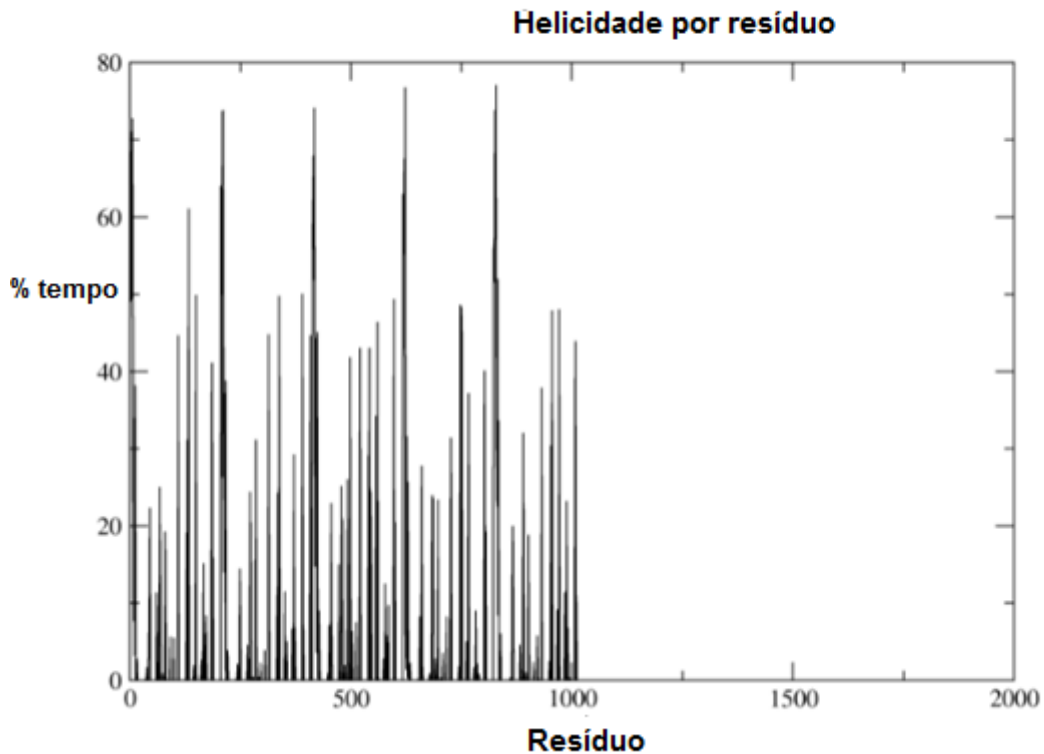


Figura 48: Helicidade por resíduo em função do tempo.

Para melhor visualização do resultado demonstrado na **Figura 48**, pode-se obter o gráfico correspondente ao comprimento das hélices no sistema (**Figura 49**). A helicidade dita o mecanismo de abertura e fechamento do canal iônico da proteína. Com a presença do ligante, a formação de helicidade é diminuída, mantendo a conformação do anel fechada, ao passo que sem ligante, a helicidade no sistema aumenta (LIMA, 2015).

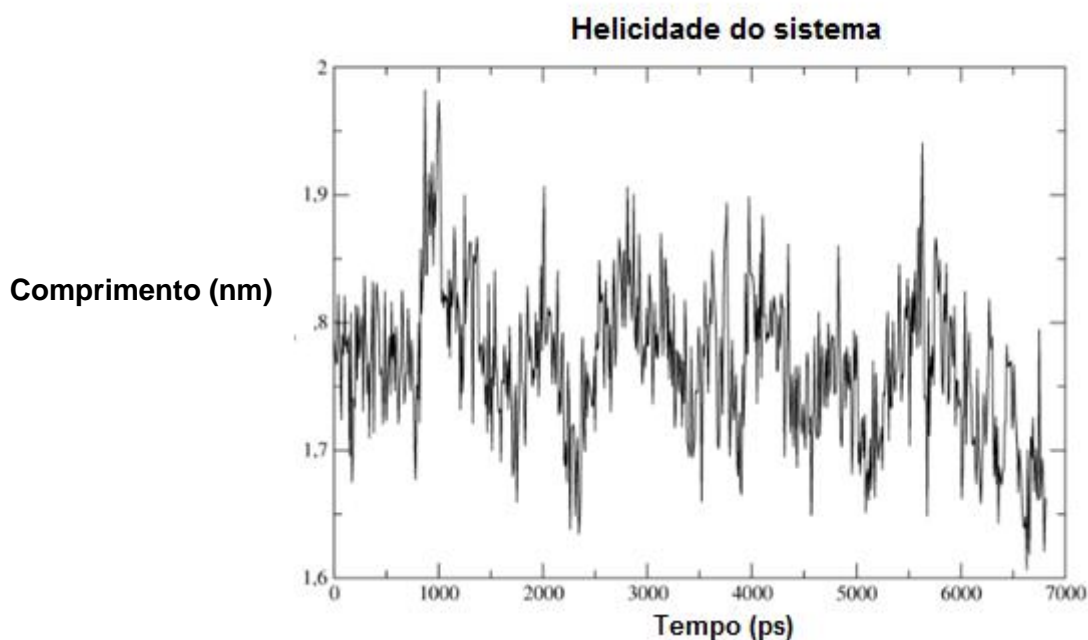


Figura 49: Gráfico correspondente ao comprimento da hélice do sistema.

5.2.2 GIROS POR RESÍDUO

O raio de giro mede a compactação de um determinado sistema globular. Desta forma, foi gerado o gráfico correspondendo ao número de giros por resíduo em termos de graus. Com base nesse gráfico (**Figura 49**), pode-se inferir que o aumento da helicidade do sistema proveniente da existência de ligações de hidrogênio na água propiciou diminuição nos graus de liberdade da proteína. Isso significa que o raio de giro permaneceu estável, revelando o alto grau de compactação proteica, reflexo do enovelamento estável da proteína (CALIXTO et al, 2014).

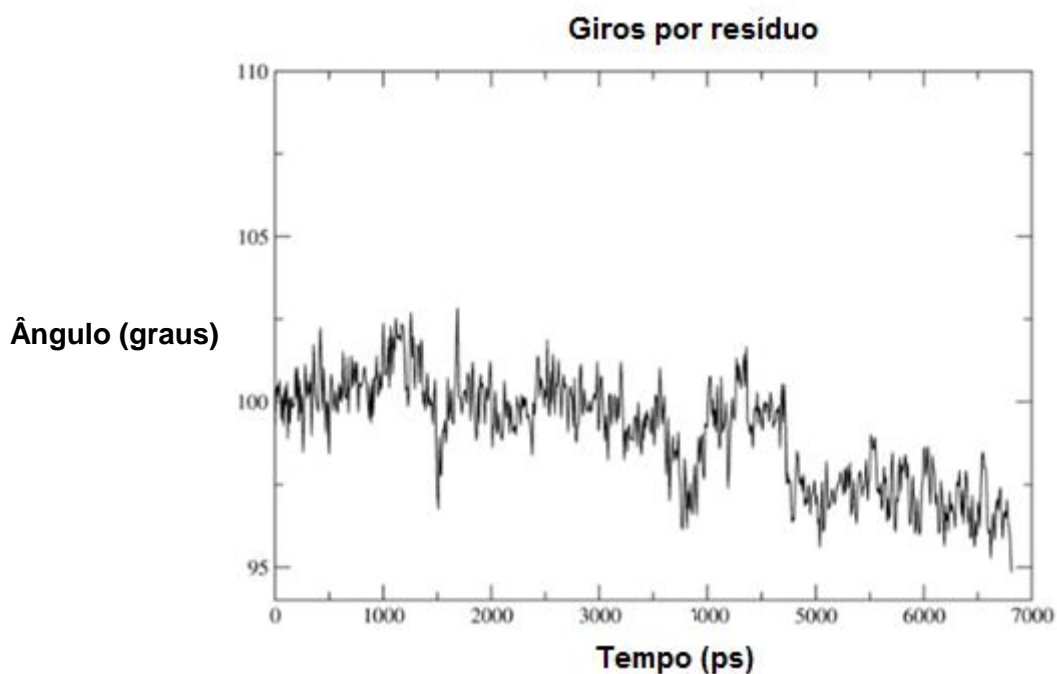


Figura 50: Giros por resíduo (em graus) em função do tempo.

5.2.3 ESTUDOS DE REDOCKING PARA VALIDAÇÃO PARA A ESTRUTURA OBTIDA POR DINÂMICA MOLECULAR

No software GOLD foi possível ranquear as poses de *docking* através de quatro funções de pontuação: GoldScore, Chemscore, ChemPLP e ASP, sendo necessário avaliar qual é mais precisa para o sistema em questão. O método de validação inicial escolhido para este trabalho foi a redocagem da lobelina avaliando o RMSD em relação à posição dos átomos pesados do ligante (64) co-cristalizado. Os valores de pontuação e RMSD obtidos para as poses de maior pontuação e de menor RMSD para cada função de pontuação estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Dados de pontuação e RMSD obtidos através da redocagem da lobelina (64) para as quatro funções de pontuação do programa GOLD.

Função	Pose	Maior pontuação	RMSD da maior pontuação	Pose	Pontuação do menor RMSD	Menor RMSD
ASP	23	41,0398	2,6930	22	39,0069	2,4764
ChemPLP	14	71,1987	6,5503	14	61,9172	2,1138
ChemScore	47	34,7063	3,6080	36	31,7951	2,4925
GoldScore	32	62,3771	5,4196	9	55,4234	5,0300

Dentre as quatro funções de pontuação utilizadas, as funções ChemPLP e GoldScore não foram capazes de prever a pose da lobelina, pois as poses de *docking* melhor ranqueadas apresentam RMSD elevado em relação às funções ASP e ChemScore, indicando que essas funções são incapazes de reproduzir o dado experimental. A princípio, a função de pontuação ASP poderia ser a mais adequada, pois a diferença entre sua maior pontuação e a pontuação atribuída à pose classificada com menor RMSD foi menor em comparação com a mesma relação nas funções ChemScore, ChemPLP e GoldScore. No entanto, ao comparar a posição de cada átomo do ligante co-cristalizado e do ligante redocado, entre a pose com menor RMSD e a pose com melhor pontuação para a função ASP, esta se mostrou inadequada porque seu critério de pontuação retorna o melhor resultado para poses que não condizem com os dados experimentais. Isto é, houve uma variação significativa na posição espacial dos átomos comparando-se as respectivas estruturas.

Dessa forma, para cada função de pontuação, foram analisados os resíduos de aminoácidos com os quais a lobelina interage, bem como os tipos de interações ligante-proteína estabelecidos: **(1)** hidrofóbica (sigma-Pi, Pi-alquil, violeta), **(2)** hidrofóbica (empilhamento-T, empilhamento-Pi), **(3)** hidrofóbica (Pi-S), **(4)** eletrostática do tipo cátion-Pi, **(5)** ligação de hidrogênio não clássica, **(7)** ligação de hidrogênio backbone (espinha-dorsal) e **(8)** ligação de hidrogênio (cadeia lateral) e **(9)** ligação Pi-par isolado (**Tabela 10**).

Tabela 10: Interações previstas para a lobelina de acordo com as funções de pontuação ASP, ChemPLP, ChemScore e GoldScore. Resíduos em vermelho são os de interesse.

Ligante 64	W145	C186	Y91	W53	L36	Y191	S324	T307	A90	L306	Y184
Asp											
ChemPLP											
ChemScore											
GoldScore											

Interações

	Hidrofóbica (Pi-alquil, sigma-Pi)		Ligação de Hidrogênio não-clássica
	Empilhamento-T		Ligação de Halogênio
	Empilhamento-Pi		Ligação de Hidrogênio backbone
	Eletrostática (cátion-Pi)		Ligação de Hidrogênio sidechain
	Ânion-Pi		Pi-S

Para a função de pontuação ChemScore, o ligante participa do máximo de interações possíveis com resíduos de interesse (12 interações). A melhor pose ranqueada para o ligante na função de pontuação ChemScore se encontra representada na **Figura 51**.

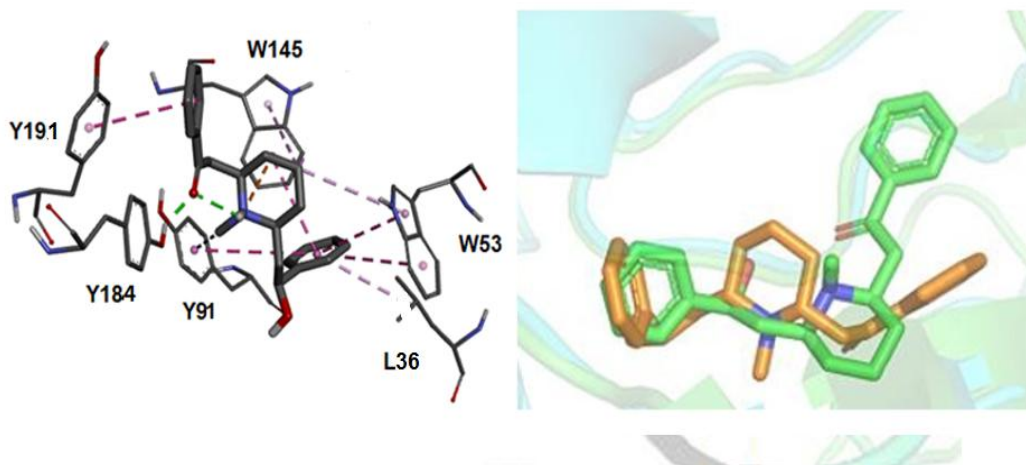


Figura 51: (a) Pose melhor ranqueada pela função de pontuação ChemScore para o ligante (lobelina) (átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza) e (b) sobreposição dos átomos do ligante (lobelina, laranja) co-cristalizado com a estrutura cristalográfica do nAChR $\alpha 7$ e do ligante (lobelina, verde) submetido à redocagem após os estudos de dinâmica molecular.

De acordo com a função de pontuação ChemScore, o ligante se encontra posicionado favoravelmente para que ocorra uma ligação de hidrogênio envolvendo um dos átomos de oxigênio do ligante e o hidrogênio da cadeia lateral do resíduo Y184. O nitrogênio pertencente à subunidade piperidínica, carregado positivamente realiza interação eletrostática do tipo cátion- π com a subunidade aromática do resíduo W145. Uma das subunidades aromáticas do ligante realiza interação hidrofóbica do tipo empilhamento-T com a subunidade aromática de Y91.

Ocorre ainda interação hidrofóbica do tipo sigma- π entre o grupo metila piperidínico do ligante com a subunidade aromática fenila de Y91. Uma das subunidades aromáticas do ligante realiza uma interação hidrofóbica do tipo empilhamento- π com a subunidade aromática do resíduo Y191. Adicionalmente, são observadas três interações hidrofóbicas do tipo empilhamento-T. Uma delas ocorre entre uma das subunidades aromáticas do ligante e uma das

subunidades aromáticas do resíduo W145, enquanto as demais acontecem entre uma das subunidades aromáticas do ligante e as subunidades aromáticas do resíduo W53. Além disso, ocorrem três interações hidrofóbicas do tipo π -alquil, sendo que duas delas acontecem entre a subunidade pirrolidínica do ligante e as subunidades aromáticas dos resíduos W145 e W53, enquanto a terceira ocorre entre uma das subunidades aromáticas do ligante e a cadeia lateral de L36.

5.2.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS ESTUDOS COMPUTACIONAIS SEM E COM DINÂMICA MOLECULAR

Com base nas informações discutidas neste trabalho e ao comparar os estudos computacionais com e sem realização de dinâmica molecular, foi possível verificar divergência entre os resultados. No caso, resultados divergentes de dados experimentais foram obtidos a partir estudos computacionais realizados com dinâmica molecular. Isso ocorre porque o resíduo C186 é um resíduo-chave do sítio ativo da lobelina e está localizado em regiões não-permitidas (conforme verificado no gráfico de Ramachandran. Outro fator está associado à influência do solvente interagindo com a proteína nos estudos de dinâmica molecular, o que não foi observado nos estudos *in silico* iniciais, pois não houve presença de moléculas de água mediando interações ligante-biomacromolécula. A esse respeito, é interessante observar que a interação do solvente com C186 contribui para a perda da estrutura protéica inicial, pois a ligação de hidrogênio mediada por água com C186 diminui a mobilidade da proteína, mantendo a conformação fechada. Pode-se dizer, portanto, que ao invés de o solvente (água) aumentar a mobilidade dos resíduos e auxiliar na estabilização da proteína mediando interações de hidrogênio com os resíduos, ela acabou desestabilizando a estrutura proteica.

Além disso, os dados de pontuação e RMSD obtidos através da redocagem da lobelina para as quatro funções de pontuação do programa GOLD foram consideravelmente maiores, se comparados ao primeiro estudo. Isso, conseqüentemente, influencia significativamente na triagem dos 28

compostos planejados. No caso, não foi possível utilizar como critério de seleção dos melhores compostos a análise das orientações espaciais de cada ligante com a lobelina, visto que não foram observadas similaridades estruturais como nos estudos anteriores.

6.0 CONCLUSÕES

O modelo computacional do nAChR $\alpha 7$ foi adequadamente analisado e implementado para realizar a triagem virtual *in silico*, tendo em vista a eleição de 8 compostos inéditos, de padrão estrutural pirrolidínico mais promissores para a etapa de síntese (sem os estudos de dinâmica molecular).

As interações tomadas como mais relevantes são as que estão presentes para o complexo lobelina-receptor, visto que esse é um dado experimental. O resíduo W145 aparenta ser o de maior importância por interagir com a maioria dos 60 ligantes da literatura usados na validação (88,3%).

Na triagem dos compostos inéditos, o resíduo Y191 aparenta ser o mais importante, pois interage com a maioria deles (92,85%). Ademais, o modelo computacional estudado sem dinâmica molecular foi melhor por apresentar resultados mais condizentes com dados experimentais.

Como perspectivas, estão previstas as etapas de síntese e avaliação farmacológica dos 8 compostos inéditos triados. Primeiramente, os ensaios farmacológicos podem ser realizados visando a obtenção de uma resposta específica para a afinidade (K_i) dos compostos pelo nAChR do subtipo $\alpha 7$, o qual se apresenta em quantidade abundante no sistema nervoso central. Testes denominados “Ligand binding” podem ser realizados tendo como objetivo prever a ligação de determinado ligante ao receptor em questão. Posteriormente, para a avaliação das propriedades farmacológicas e funcionais dos derivados planejados, podem ser realizados estudos eletrofisiológicos como o registro de *patch clamp* em células expressando os nAChRs do subtipo $\alpha 7$.

7. REFERÊNCIAS

ATZORI, M.; F. G. OSCOS; ARIAS, H. R. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor-mediated anti-inflammatory actions modulate brain functions. *Current Signal Transduction Therapy*, v. 11, n. 1, p. 1-13, Feb. 2016.

AYLLÓN, M. S. G et al. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with P-Tau and β -amyloid. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 4, p. 1- 9, Sep. 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 536 p.

BATISTA, V. S.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Receptores Nicotínicos de Acetilcolina dos Subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$: Características, Participação em Processos Patogênicos e Compostos Bioativos. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 5, p.1721-17-39, Jul. 2016.

BAXTER, C. A. et al. Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity. *Proteins*, v. 33, n. 3, p. 367-382, Mar. 1998.

BEINAT, C. et al. Structure-activity relationship studies of SEN12333 analogues: determination of the optimal requirements for binding affinities at $\alpha 7$ nAChRs through incorporation of known structural motifs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 95, p. 277-301, May. 2015.

BRIGGS, C. A.; MCKENNA, D. G. Activation and Inhibition of the Human Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor by Agonists. *Neuropharmacology*, v. 37, p. 1095-1102, Sep. 1998.

BRISTOW, L. J. et al. The novel, nicotinic alpha7 receptor partial agonist, BMS- 933043, improves cognition and sensory processing in preclinical models of schizophrenia. *PLOS ONE*, p. 1-29, Jul. 2016.

BRUNZELL, D. H.; STAFFORD, A. M.; DIXON, C. I. Nicotinic receptor contributions to smoking: insights from human studies and animal models. *Current Addiction Reports*, v. 2, n. 1, p. 33-46, Feb. 2015.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics*, v. 126, n. 1, Jan. 2007.

BUTZLAFF, M.; E. PONIMASKIN, E. The role of serotonin receptors in Alzheimer's disease. *Opera Medica et Physiologia*, v. 2, n. 1, p. 77-86, Mar. 2016.

CALIXTO, P. H. M. Dinâmica molecular da adenosina deaminase de

Edwardsiella tarda em água - Tutorial experimental. *Biota Amazônia*, v. 5, n. 4, p. 8-14, Jul. 2015.

CANNON, J. G. Pharmacology for Chemists. *The Cholinergic System*. 2. ed. Oxford: Copyright, cap 8, p. 131-149, 2007.

CARUGO, O. How root-mean-square distance (r.m.s.d.) values depend on the resolution of protein structures that are compared. *Journal of Applied Crystallography*, v. 36, p. 125-128, Feb. 2003.

CESTARI, J. A. F. *Comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer: prevalência de infecção bucal e níveis séricos de parâmetros inflamatórios*. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CHENG, Q; YAKEL, J. L. The effect of $\alpha 7$ nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus. *Biochemical Pharmacology*, v. 97, n. 4, p. 439-444, Oct. 2015.

CLAEYSEN, S.; BOCKAERT, j.; GIANNONI, P. Serotonin: a new hope in Alzheimer's disease?. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 6, n. 7, p. 940-943, Jul. 2015.

COE, J. W. et al. Varenicline: An $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptor Partial Agonist for Smoking Cessation. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 10, p. 3474-3477, May. 2005.

COLOVIC, M. D. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology, *Current Neuropharmacology*, v. 11, n. 3, p. 315-335, May. 2013.

COSTANTINI, L. C. et al. Hypometabolism as a therapeutic target in Alzheimer's disease, *BMC Neuroscience*, 9 p. 1-9, Oct. 2008.

CUMMINGS, J. I. et al. A practical algorithm for managing Alzheimer's disease: what, when, and why?. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, v. 2, n. 3, p. 307-323, Mar. 2015.

COSTANZO, P. et al. L. Design, synthesis and evaluation of donepezil-like compounds as AChE and BACE-1 inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 7, n. 5, 470-475, 2016.

DINIZ, L. P. et al. Astrocyte transforming growth factor beta 1 protects synapses against A β oligomers in Alzheimer's disease model. *Journal of Neuroscience*, v. 37, n. 28, p. 6797-6809, Jul. 2017.

DUCE, J. A.; BUSH, A. I, Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Progress in Neurobiology*, v. 92, n. 1, p. 1-18, Mar. 2010.

ELDRIDGE, M. D et al. Empirical scoring functions: I. The development of a

fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 11, n. 5, p.425-445, Sep. 1997.

ETEGHAD, S. et al. Effect of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor activation on beta-amyloid induced recognition memory impairment. Possible role of neurovascular function. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 30, n. 11, p. 736-742, Nov. 2015.

FANG, R. et al. Music therapy is a potential intervention for cognition of Alzheimer's Disease: a mini-review. *Translational Neurodegeneration*, v. 6, n. 2, p. 1-8, Feb. 2017.

GALLIVAN, J. P.; DOUGHERTY, D. A. Cation-pi interactions in structural biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, p. 9459-9464, Apr. 1999.

GELDENHUYS, W. J.; SCHUYF, C. J. V. Role of serotonin in Alzheimer's disease: a new therapeutic target?, *CNS Drugs*, v. 25, n. 9, p. 765-781, Sep. 2011.

GILLIS, E. P. et al. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, n. 21, p. 8315-8359, Nov. 2015.

GIRDHAR, S. et al. Plant derived alkaloids in major neurodegenerative diseases: from animal models to clinical trials. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, v. 1, n. 3, p. 91-100, Nov. 2015.

GUTIERREZ, B. A. O. Impacto econômico da doença de Alzheimer no Brasil: é possível melhorar a assistência e reduzir custos?. *Ciência & Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 11, p. 4479-4486, Apr. 2014.

GRADY, S, R. et al. The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum. *Biochemical Pharmacology*, v. 74, n. 6, p. 1235-1246, Jul. 2007.

GRILL, J. D.; CUMMINGS, J. L. Novel targets for Alzheimer's disease treatment. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 10, n. 5, p. 711-728, Aug. 2010.

GRUPE, M. et al. Targeting $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in central nervous system disorders: perspectives on positive allosteric modulation as a therapeutic approach. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 116, n. 3, p. 187-200, Mar. 2015.

HALL, J. R. et al. Total testosterone and neuropsychiatric symptoms in elderly men with Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, v. 7, n. 1, p. 1-6, May. 2015.

HECKMAN, P. R.A.; WOUTERS, C.; Prickarts, J. Phosphodiesterase inhibitors as a target for cognition enhancement in aging and Alzheimer's disease: a translational overview. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 3, p. 1-15, Jul. 2015.

HILLMER, A. T. et al. The effects of lobeline on $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptor binding and uptake of [^{18}F]nifene in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 214, n. 2, p. 163-169, Apr. 2013.

HIPPIUS, H; NEUNDÖFER, M. D. G. The discovery of Alzheimer's disease. *Clinical Research*, v. 5, n. 1, p. 101-108, Mar. 2003.

HURST, R; ROLLEMA, H; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 137, n. 1, p. 22-54, Jan. 2013.

JUMA, K. K. A current understanding of Alzheimer's disease and the prospects of phytopharmacological intervention as a management strategy. *Journal of Neurology Disorder*, v. 3, n. 4, p. 1-7, Sep. 2015.

Li, M. et al. Donepezil markedly improves long-term survival in rats with chronic heart failure after extensive myocardial infarction. *Circulation Journal – Official Journal of the Japanese Circulation Society*, v. 77, n. 10, p. 2520-2525, Jul. 2013.

LI, S. X. et al. Ligand-binding domain of an $\alpha 7$ -nicotinic receptor chimera and its complex with agonist. *Nature Neuroscience*, v. 14, n. 10, p. 1253-1259, Sep. 2011.

LIMA, C. H. S. Dinâmica molecular de sistemas aquosos da enzima enoil-ACP redutase de *Mycobacterium tuberculosis*. 2015. 156f. Doutorado (Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2015.

LIU, C. C. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nature Reviews Neurology*, v. 9, n. 2, p. 106-118, Feb. 2013.

LOMBARDO, S.; MASKOS, U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*, v. 96, n. 18, p. 255-262, Sep. 2015.

KORB, O; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modelling*, v. 49, n. 1, p. 84-96, Jan. 2009.

MANDAL, P. K.; KANSARA, K.; DABAS, A. The GABA-working memory relationship in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, v. 1, n. 1, p. 43-45, Jun. 2017.

MAZUROV, A. A; SPEAKE, J. D; YOHANNES, D. Discovery and development of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, n. 12, p. 7943-7961, Dec. 2011.

MAZUROV, A. et al. 2-(Arylmethyl)-3-substituted quinuclidines as selective $\alpha 7$ nicotinic receptor ligands. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 8, p. 2073-207, Apr. 2005.

MILLER, B. W; WILLETT, K. C. Rosiglitazone and pioglitazone for the treatment of Alzheimer's disease. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 45, n. 11, p. 1416-1424, 2011.

MOJSA, W. The prevalence of Alzheimer's disease and dementia in Alzheimer's disease in patients of long-term nursing home care in the Podlaskie province in Poland. *Advances in Alzheimer's Disease*, v. 4, n. 3, p. 90-97, Sep. 2015.

MOLINO, I. et al. Efficacy of Memantine, Donepezil, or Their Association in Moderate-Severe Alzheimer's Disease: A Review of Clinical Trials. *Scientific World Journal*, 1-8, Oct. 2013.

MOOJI, W. T; VERDONK, M. L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, v. 61, n. 2, p. 272-287, Nov. 2005.

MORRIS, J. K. Is Alzheimer's disease a systemic disease?. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1842, n. 9, p. 1340-1349, Sep. 2014.

MUSHTAQ, G.; KHAN, J. A.; KAMAL, M. A. Impaired glucose metabolism in Alzheimer's disease and diabetes. *Enzyme Engineering*, v. 4, n. 1, p. 1-4, Oct. 2015.

NADDAFI, F.; MIRSHAFIEY, A. The neglected role of histamine in Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, v. 28, n. 4, p. 327-336, May. 2013.

NAGEL, W. E.; KRÖNER, D. B.; RESCH, M. M. *High Performance Computing in Science and Engineering: Transactions of the High Performance Computing Center Stuttgart (HLRS)*. Germânia: Springer, 2009.

NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. A relação entre fragmentos estruturais oriundos de produtos naturais e compostos bioativos. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 2, p. 697-712, Jan. 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 907 p.

OKADA-JÚNIOR, C. W et al. Phthalimide Derivatives with Bioactivity

against *Plasmodium falciparum*: Synthesis, Evaluation, and Computational Studies Involving bc_1 Cytochrome Inhibition. *ACS Omega*, v. 3, n. 8, p. 9424-9430, Aug. 2018.

ONDACHI, P. W. et al. Synthesis, nicotinic acetylcholine binding, *in vitro* and *in vivo* pharmacological properties of 2'-fluoro (carbamoyl pyridinyl)deschloro epibatidine analogs. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 7, n. 7, p. 1-3, May. 2016.

OSTA, A. G. et al. Phosphodiesterases as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 3, n. 11, p. 832-844, Nov. 2012.

OSTAN, R. Gender, aging and longevity in humans: an update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine. *Clinical Science*, v. 130, n. 19, p. 1711-1725, Oct. 2016.

OZ, M. On the interaction of β -amyloid peptides and $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, v. 10, n. 6, p. 618-630, Jul. 2013.

PARREGUEZ, M. F. Neonicotinic analogues: selective antagonists for $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 10, p. 2687-2690, May. 2013.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions I single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, v. 52, n.12, p. 7182-7190, Aug. 1981.

PATERSON, D; NORDBERG, A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology*, Huddinge, v. 61, n. 1, p. 75-111, May. 2000.

PEREZ, C. L. M.; NOVIELLO, C. M.; HIBBS, R. E. X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature*, v. 538, n. 7625, p. 411-415, Oct. 2016.

PETERSEN, J. G. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of 6-aminonicotinic acid analogues as novel GABA_A receptor agonists. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 84, p. 404-416, Sep. 2014.

PITHADIA, A. Pathophysiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease (AD). *Journal of Pharmacology*, v. 6, n. 1, Jan. 2008.

PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, v. 29, p. 845-854, Apr. 2013.

QIU, W. W. Q. Angiotensin converting enzyme inhibitors and Alzheimer disease in the presence of the apolipoprotein E4 allele. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 22, n. 2, p. 177-185, Feb. 2014.

- RICCIARELLI, R.; FEDELE, E. Phosphodiesterase 4D: an enzyme to remember. *British Journal of Pharmacology*, v. 172, n. 20, p. 4785-4789, Jul. 2015.
- ROCCA, W. A. et al. White, Trends in the incidence and prevalence of Alzheimer's disease, dementia, and cognitive impairment in the United States. *Alzheimer's & Dementia*, v. 7, n. 1, p. 80-93, Jan. 2011.
- SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, p. 49-57, Feb. 2009.
- SARGSYAN, K; GRAUFFEL, C; LIM, C. How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Theory and Computacional*, v. 13, n. 4, p. 1518-1524, Apr. 2017.
- SCIMEMI, A. Structure, function, and plasticity of GABA transporters. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, p. 1-14, Jun. 2014.
- SCOTT, D. E. et al. Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. *Biochemistry*, v. 51, n. 25, p. 4990-5003, Jun. 2012.
- SCRIMPF, M. R. et al. SAR of $\alpha 7$ nicotinic receptor agonists derived from tilorone: exploration of a novel nicotinic pharmacophore. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 4, p. 1633-1638, Feb. 2012.
- SPURNY, R. et al. Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 19, p. 2543-2552, May. 2015.
- STANBURY, J. et al. The use of lobelia in the treatment of asthma and respiratory illness. *Journal of Restorative Medicine*, v. 2, n. 1, p. 94-100, Oct. 2013.
- SURESH, A.; HUNG, A. Molecular simulation study of the unbinding of $\alpha 7$ -conotoxin [Y4E]GID at the $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 70, p. 1-39, Nov. 2016.
- TEIXEIRA, J. B. et al. Mortality from Alzheimer's disease in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 3, n. 3, p. 850-860, Apr. 2015.
- TÕUGU, V. Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, v. 1, n. 2, p. 155-170, Aug. 2001.

VERA, G. et al. Extended N-arylsulfonylindoles as 5-HT₆ receptor antagonists: design, synthesis & biological evaluation. *Molecules*, v. 21, n. 8, p. 1-35, May. 2016.

VIEGAS, F. P. D. et al. Doença de Alzheimer: caracterização, evolução e implicações do processo neuroinflamatório. *Revista Virtual de Química*, v. 3, n. 4, p. 286- 306, Oct. 2011.

VIEIRA, T. H. F. et al. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curent Pharmacology*, v. 14, n. 1, p. 101-115, Jan. 2016.

VOHORA, D.; BHOWMIK, M. Histamine H₃ receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia and drug abuse. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 6, p. 1-10, Oct. 2012.

WANG, X. et al. Activation of α 7-containing nicotinic receptors on astrocytes triggers AMPA receptor recruitment to glutamatergic synapses. *Journal of Neurochemistry*, v. 127, n. 5, p. 632-643, Dec. 2013.

WHO global action plan on the public health response to dementia 2017- 2025, p. 1-22, 2016.

WINGEN, K; STARK, H. Scaffold variations in amine warhead of histamine H₃ receptor antagonists. *Drug Discovery TodayTechnologies*, v. 10, p. 483-489, Dec. 2013.

WOLF, A. B et al. APOE & Neuroenergetics: an Emerging Paradigm in Alzheimer's Disease. *Neurology of Aging*, v. 34, n. 4, p. 1-23, Apr. 2012.

ZANALETTI, R. et al. Discovery of a novel alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist series and characterization of the potent, selective, and orally efficacious agonist 5-(4- Acetyl[1,4]diazepan-1- yl)pentanoic acid [5-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-3- yl] amide (SEN15924, WAY- 361789). *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, n. 10, p. 4806-23, May. 2012.

8. ANEXOS

ANEXO 1: ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA FASTA DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DO nAChR $\alpha 7$ (PDB ID: 5AFN) E DA SEQUÊNCIA FASTA DO nAChR $\alpha 7$ DA ESPÉCIE HUMANA, REALIZADA NO SÍTI0 PROTEÔMICO DO NCBI.

5AFN:D|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

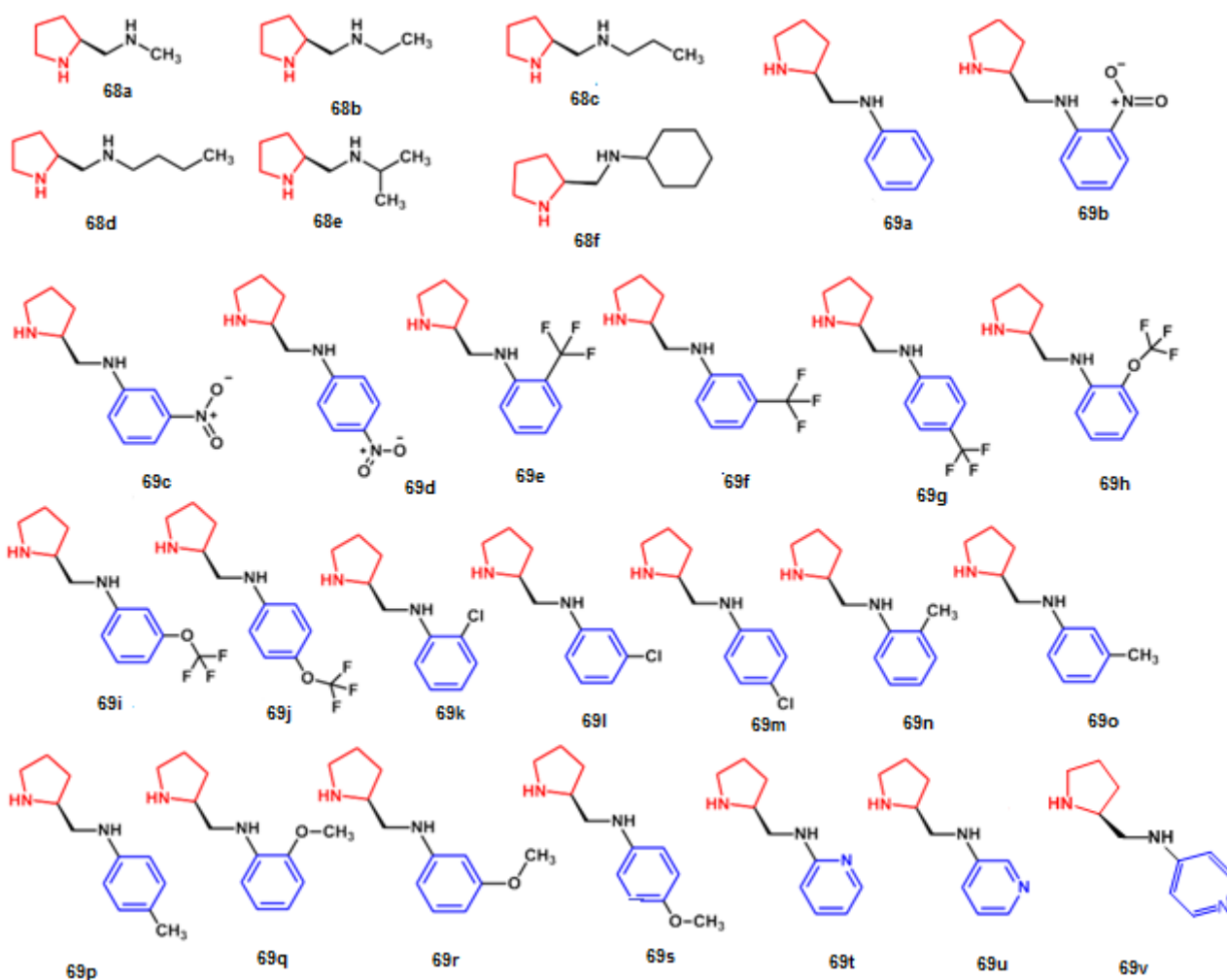
Sequence ID: Query_111472 Length: 207 Number of Matches: 2

Range 1: 1 to 204 [Graphics](#)

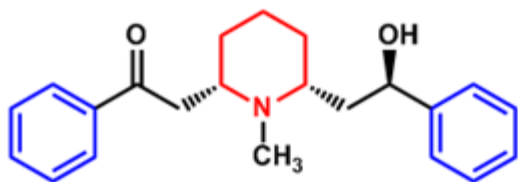
▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
254 bits(648)	2e-86	Compositional matrix adjust.	133/210(63%)	150/210(71%)	9/210(4%)
Query 23	GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSLSLLOIMDVDEKNQVLTNIIWLQMSW				82
Sbjct 1	GEFQRKLYKELVKNIYP P D +P+TVYFSLSLLOIMDVDEKNQV+ WLQMSW				59
Query 83	TDHYLQWNVSEYPGVKTRVFPDQGIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHQYLP				142
Sbjct 60	TDHYLQWNVSEYPGVK V P +W PD+ YN A + + LVNSSGH QYLP				118
Query 143	PGIFKSSCYIDVRWFPFDVQH---CKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLV				199
Sbjct 119	+ SC + D + CKLKFGSW++ LDLQMQEADISGYIP ++LV				174
Query 200	GIPGKRSERFYECCKEYPDVTFTVTMRRR		229		
Sbjct 175	G+ KRSERFYECCKEYPDVTFTVT R++				
	GVTQKRSERFYECCKEYPDVTFTVTRKK		204		

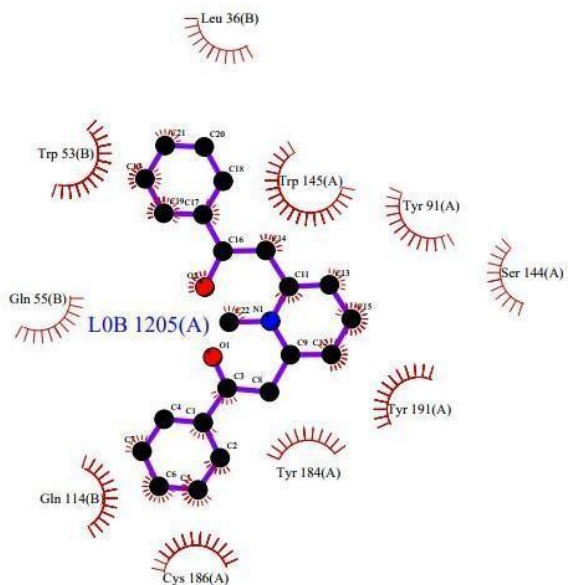
ANEXO 2: COMPOSTOS DE PADRÃO PIRROLIDÍNICO PLANEJADOS COMO AGONISTAS DE RECEPTORES $\alpha 7$.



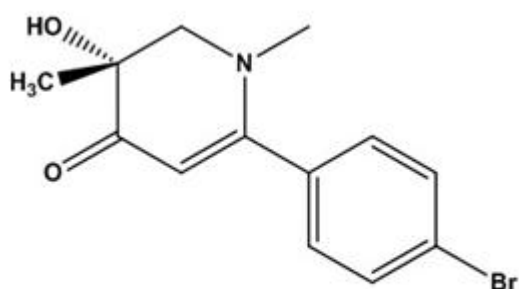
ANEXO 3: RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DO SÍTIO ORTOSTÉRICO, OS QUAIS SÃO MODULADOS PELA LOBELINA (PDB ID:5AFN).



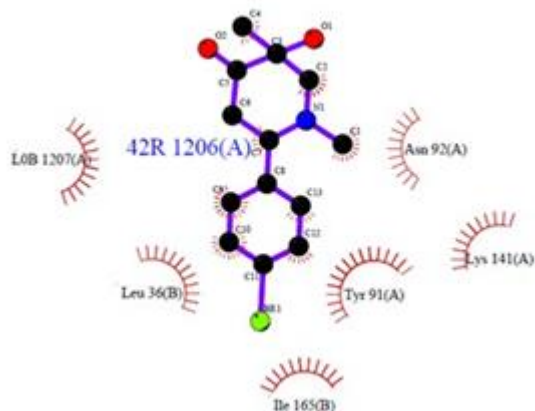
71



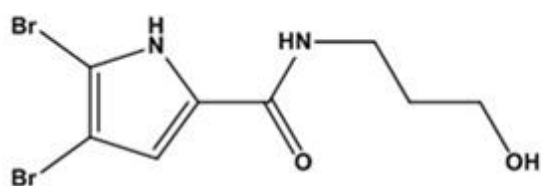
ANEXO 4: RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS REFERENTES AO nAChR $\alpha 7$ QUIMÉRICO CO-CRISTALIZADO COM A MOLÉCULA 6-(4-BROMOFENIL)-3-HIDRÓXI-1,3-DIMETIL-2H-PIRIDIN-4-ONA (PDB ID: 5AFJ), NO AGONIST SUBPOCKET.



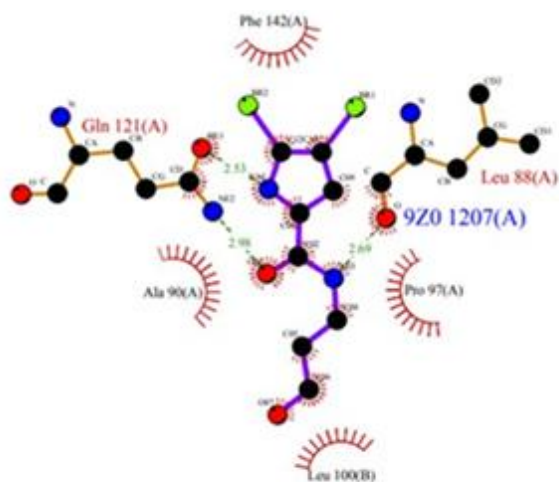
72



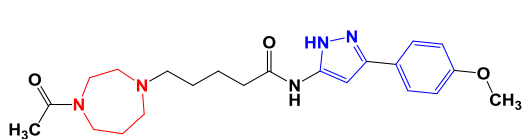
ANEXO 5: RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS REFERENTES AO nAChR $\alpha 7$ QUIMÉRICO CO-CRISTALIZADO COM A MOLÉCULA 4,5-DIBROMO-N-(3-HIDRÓXIPROPIL)-1H-PIRROL-2-CARBOXAMIDA (PDB: 5AFM), NO VESTIBULE POCKET.



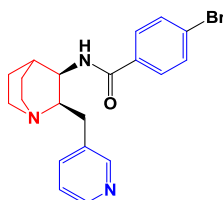
73



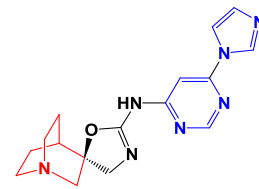
ANEXO 6: SUBSTÂNCIAS MUITO ATIVAS FRENTE AOS nAChRs $\alpha 7$ (BRISTOW et al, 2016; MAZUROV; SPEAKE; YOHANNES, 2009; MAZUROV et al, 2005; ZANALETTI et al, 2012).



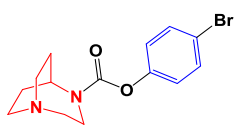
SEN15924, WAY- 361789, $K_i = 3$ nM (74)



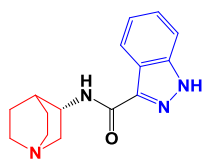
Quinuclidina análogo 24, $K_i = 7$ nM (75)



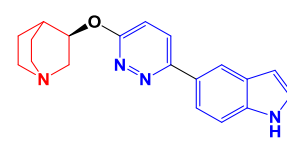
BMS-933043, $K_i = 8,1$ nM (76)



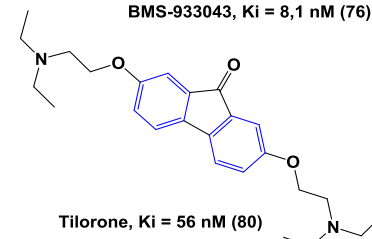
SSR180711, $K_i = 14$ nM (77)



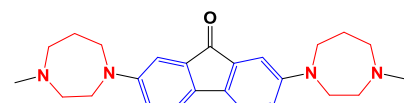
MEM 3454, $K_i = 10$ nM (78)



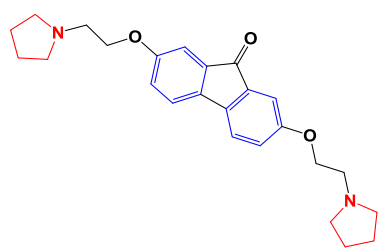
ABT-107, $K_i = 7$ nM (79)



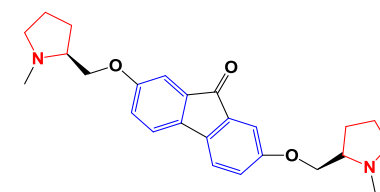
Tilorone, $K_i = 56$ nM (80)



N-metilhomopiperazina análogo 34, $K_i = 6,5$ nM (81)

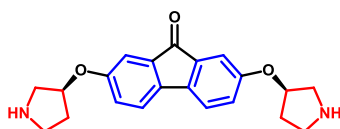


2,7-Bis[2-(1-pirrolidinil)etóxi]-9H-fluoren-9-ona, $K_i = 53$ nM (82)

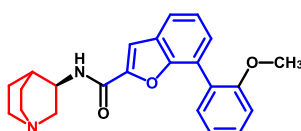


Prolinolol, $K_i = 7,6$ nM (83)

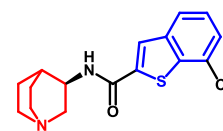
ANEXO 7: SUBSTÂNCIAS MUITO ATIVAS FRENTE AOS nAChRs $\alpha 7$ (SPEAKE; YOHANNES, 2009; MAZUROV et al, 2005; ZANALETTI et al, 2012).



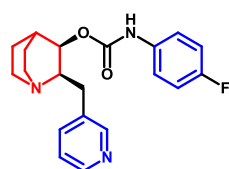
Pirrolidina análogo 27, $k_i = 71$ nM (84)



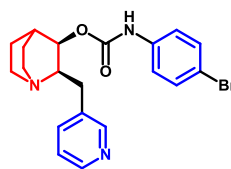
ABBF, $K_i = 62$ nM (85)



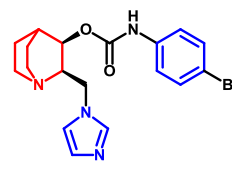
EVP-6124, $K_i = 4,3$ nM (86)



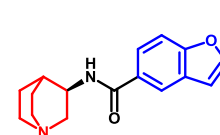
Quinuclidina análogo 19, $k_i = 6$ nM (87)



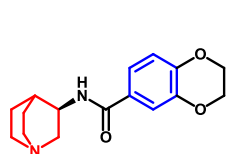
Quinuclidina análogo 12, $K_i = 5$ nM (88)



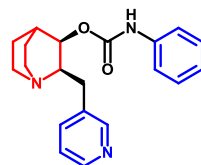
Quinuclidina análogo 14, $K_i = 10$ nM (89)



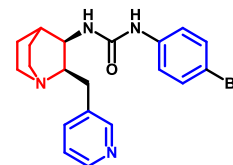
PHA-543613, $K_i = 8,8$ nM (90)



PHA-568487, $K_i = 44$ nM (91)

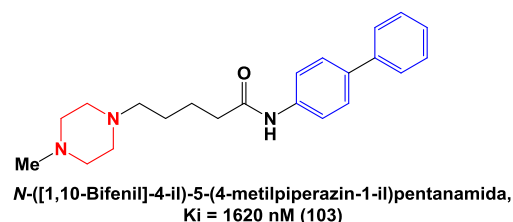
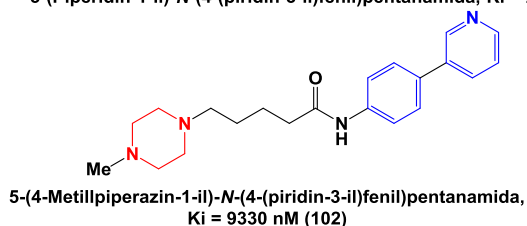
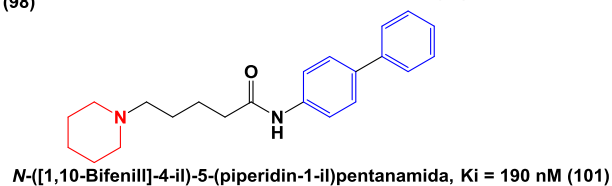
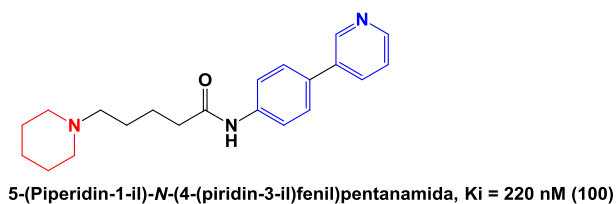
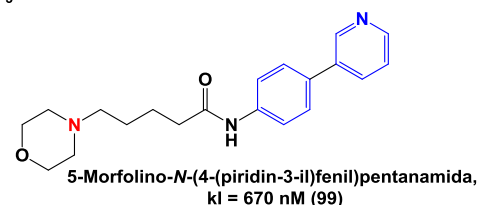
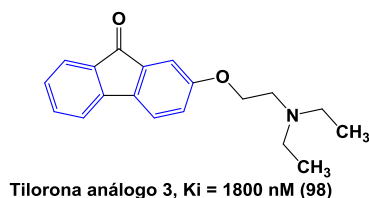
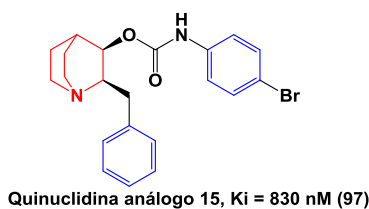
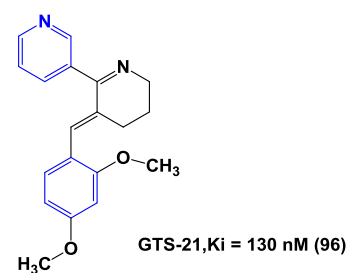
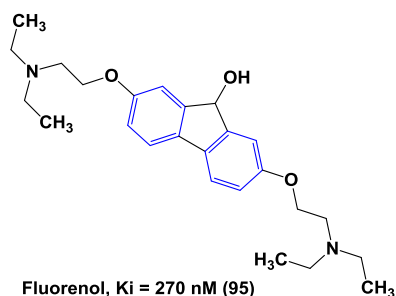
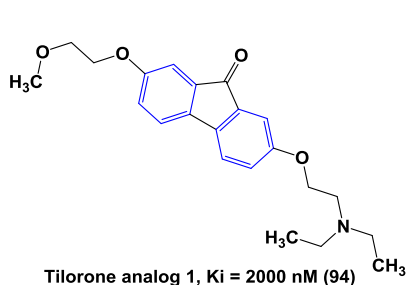


Quinuclidina análogo 20, $K_i = 7$ nM (92)

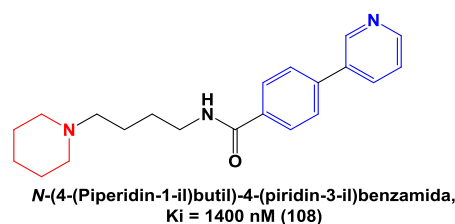
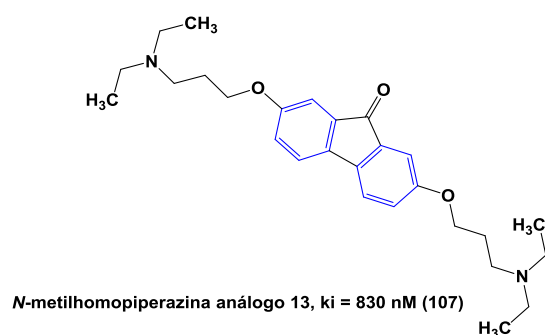
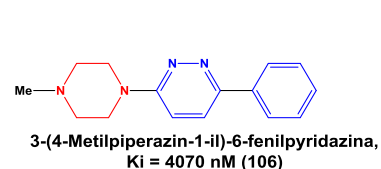
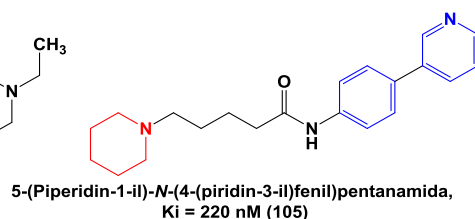
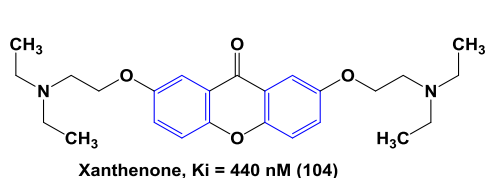


Quinuclidina análogo 23, $K_i = 7$ nM (93)

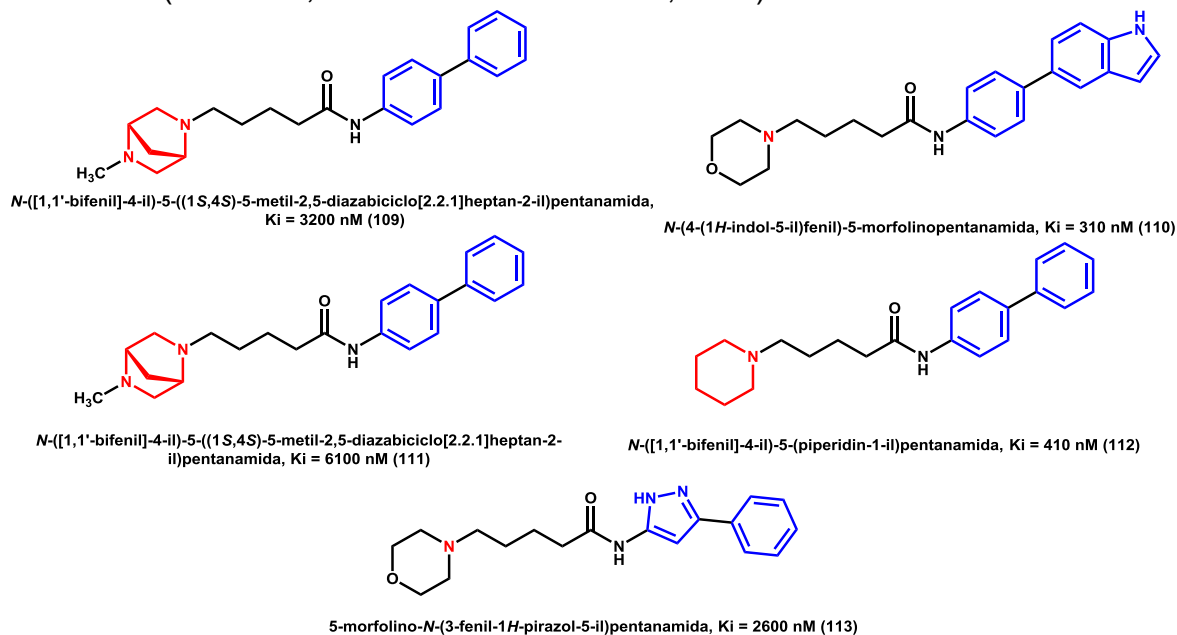
ANEXO 8: SUBSTÂNCIAS ATIVAS OU COM POUCA ATIVIDADE FRENTE AOS nAChRs $\alpha 7$ (BATISTA; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2016; BEINAT et al, 2015; HURST; ROLLEMA; BERTRAND, 2013; MAZIROV; SPEAKE; YOHANNES, 2011; ZANALETTI et al, 2012).



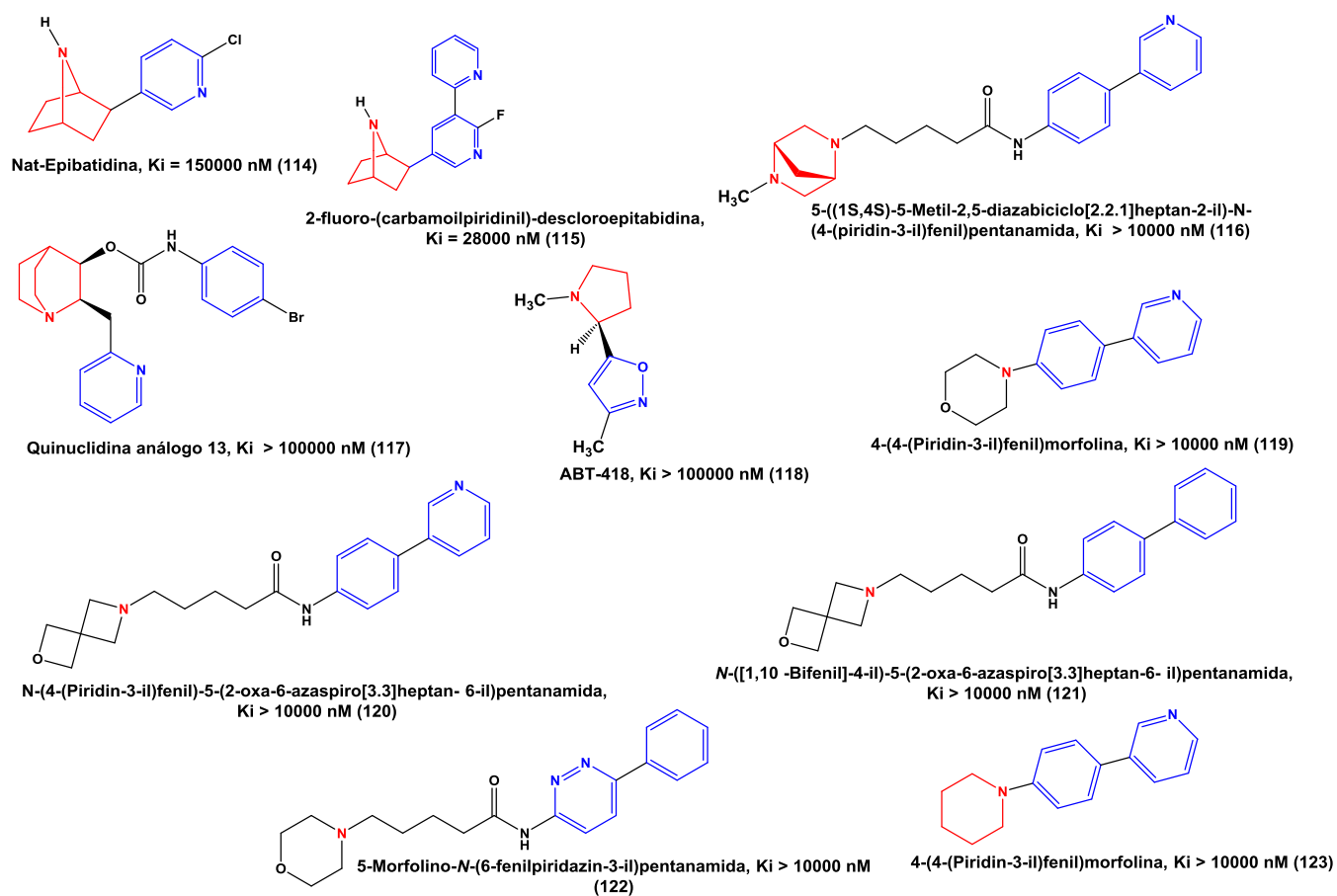
ANEXO 9: SUBSTÂNCIAS ATIVAS OU COM POUCA ATIVIDADE FRENTE AOS nAChRs $\alpha 7$ (BEINAT et al, 2015; SCRIMPF et al, 2015; ZANALETTI et al, 2012).



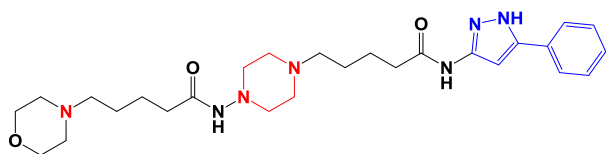
ANEXO 10: SUBSTÂNCIAS ATIVAS OU COM POUCA ATIVIDADE FRENTE AOS nAChRs $\alpha 7$ (BATISTA; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2016).



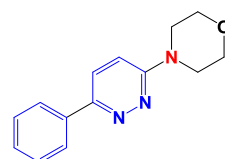
ANEXO 11: SUBSTÂNCIAS INATIVAS FRENTE AOS nAChRs $\alpha 7$ (BEINAT et al, 2015; BRIGGS; MCKENNA, 1998; MAZUROV et al, 2005; ONDACHI et al, 2016).



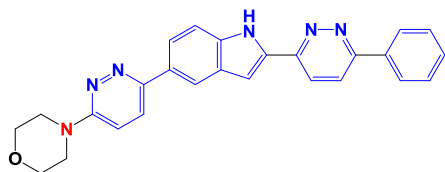
ANEXO 12: SUBSTÂNCIAS INATIVAS FRENTE AOS nAChRs $\alpha 7$ (BEINAT et al, 2015; SCRIMPF et al, 2012; ZANALETTI et al, 2012).



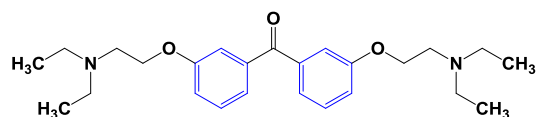
5-(4-Metilpiperazin-1-il)-N-(5-fenil-1H-pirazol-3-il, $K_i > 10000$ nM (124)



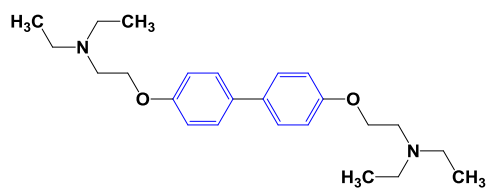
4-(6-fenilpiridazin-3-il)morfolina, $K_i > 10000$ nM (125)



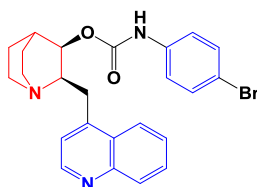
4-(6-(1H-indol-6-il)piridazin-3-il)morfolina, $K_i > 10000$ nM (126)



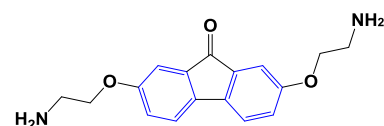
Benzofenona análogo 12, $K_i = 68000$ nM (127)



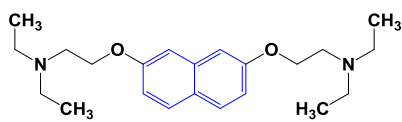
Bifenil análogo 11, $K_i > 10^6$ nM (131)



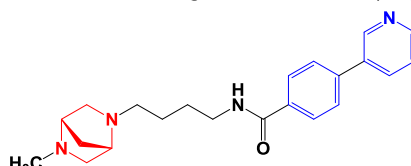
Quinuclidina análogo 16, $K_i > 10000$ nM (132)



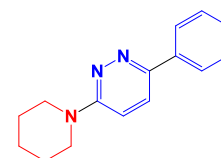
Tilorona derivado 15, $K_i = 15000$ nM (133)



Naftaleno derivado 10, $K_i > 10^6$ nM (134)



N-(4-((1S,4S)-5-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il)butil)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida, $K_i > 10000$ nM (135)



3-fenil-6-(piperidin-1-il)piridazina, $K_i > 10000$ nM (136)

ANEXO 13: INTERAÇÕES PREVISTAS PARA OS 20 LIGANTES MUITO ATIVOS DA LITERATURA. RESÍDUOS EM VERMELHO SÃO OS DE INTERESSE.

Ligante	D160	Y91	Y184	W145	W53	Y167	Y191	C186	L36	L116	S144	K141	K139	C187	C187
27															
28															
29															
30															
31															
34															
35															
36															
18															
20															
21															
33															
36															
24															
25															
26															
32															
33															
37															
23															

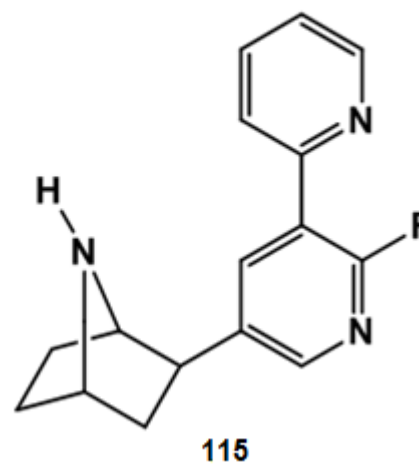
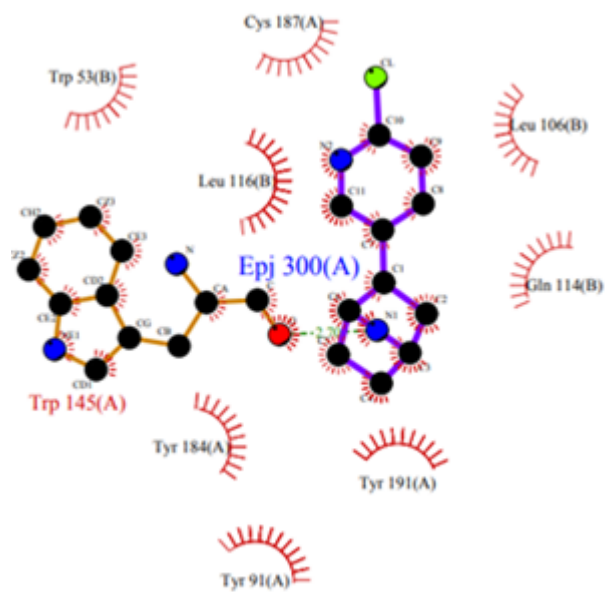
ANEXO 14: INTERAÇÕES PREVISTAS PARA OS 20 LIGANTES ATIVOS OU POUCO ATIVOS DA LITERATURA. RESÍDUOS EM VERMELHO SÃO OS DE INTERESSE.

Ligante	W145	L36	V51	Y91	S144	Y191	L116	C186	Y184	W53	C187	D160	Q114	K139	S57	Q157
47	Green	Orange	Purple													
55					Light Blue											
53	Green	Orange	Purple	Purple												
54	Purple						Purple	Brown	Dark Blue	Purple	Purple	Dark Blue			Light Blue	Dark Green
56	Green		Purple	Purple		Orange		Purple	Orange							
57	Light Blue	Light Blue	Purple	Purple		Purple		Dark Blue	Purple	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue				
50	Purple	Purple	Purple		Light Blue	Light Blue	Dark Blue		Purple	Purple	Dark Blue	Dark Blue				
48	Dark Blue	Dark Blue			Dark Blue	Dark Blue	Orange		Dark Blue			Orange				
41	Dark Blue	Dark Blue				Dark Blue		Green	Dark Blue	Dark Blue	Purple	Orange	Light Blue			
44			Purple					Dark Blue	Green	Dark Blue	Dark Blue	Purple				
38	Light Blue					Dark Blue		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Orange				
52	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue			Purple		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Purple		Light Blue			
39	Light Blue					Dark Blue		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Orange				
40	Dark Blue			Dark Blue		Purple	Purple	Brown	Dark Blue	Purple	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue			
42	Dark Blue					Purple	Purple	Purple	Dark Blue	Dark Blue	Orange	Orange			Purple	
43	Dark Blue	Dark Blue		Purple		Dark Blue		Purple	Green	Purple	Dark Blue	Dark Blue	Purple			
44	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue					Dark Blue	Dark Blue	Purple	Dark Blue	Dark Blue				
45	Dark Blue	Dark Blue		Purple		Dark Blue		Green	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Purple			
46		Orange			Orange		Purple	Brown		Purple	Dark Blue	Dark Blue			Purple	
51	Light Blue			Purple	Purple			Brown		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue				

ANEXO 15: INTERAÇÕES PREVISTAS PARA OS 20 LIGANTES INATIVOS DA LITERATURA. RESÍDUOS EM VERMELHO SÃO OS DE INTERESSE.

Ligante	D160	Y91	Y184	W145	W53	Y167	Y191	C186	L36	L116	S144	K141	K139	C187	E 185	C125	Y167	S34	G163	V50	I165
68			■	■	■	■	■	■	■												
69			■	■	■		■	■	■		■		■	■		■					
70	■		■	■	■	■	■	■	■												
73			■		■		■	■	■					■							
76			■	■	■	■	■	■	■				■								
71	■		■		■	■	■	■	■	■					■	■					
72	■		■		■	■	■	■	■						■						
75			■	■	■		■	■	■												
77			■		■	■	■	■	■												
74			■	■	■	■	■	■	■		■										
60			■	■	■	■	■	■	■			■	■								■
59	■		■	■	■	■	■	■	■										■	■	
61	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■								■	■	
63			■	■	■	■	■	■	■	■											
64	■	■	■	■	■	■	■	■	■												
65			■	■	■	■	■	■	■												
66	■		■	■	■	■	■	■	■												
58	■		■	■	■	■	■	■	■												
62			■	■	■	■	■	■	■												
67			■	■	■	■	■	■	■												

ANEXO 16: Resíduos de aminoácidos do sítio ortostérico, os quais são modulados pela epibatidina (PDB ID: 3SQ6).



ANEXO 17: Comandos utilizados nos estudos de dinâmica molecular

Etapas	Comandos utilizados
Preparo da Topologia	<pre>gmx pdb2gmx -f 5afn.pdb -o 5afn.gro; gmx pdb2gmx -f 5afn-editado.pdb -o 5afn.gro</pre>
Definição do tamanho da hipercaixa	<pre>gmx edit conf -f 5afn.gro -o 5afn.gro -</pre>
Solvatação da proteína	<pre>gmx solvate -cp 5afn.gro -cs tip4p.gro -o 5afn_solv.gro - p topol.top; gmx grompp-fions.mdp-c 5afn_solv.gro -p topol.top -o ion.tpr; gmx genion -sions.tpr -c 5afn_solv.gro -p topol.top -np 9</pre>
Minimização energética da estrutura	<pre>gmx grompp -f minim.mdp -c 5afn_solv_ions2.gro -p topol.top -o em.tpr</pre>
Equilibração do sistema	<pre>gmx grompp -f nvt-50K.mdp -c em.gro -p topol.top -o nvt- 50K.tpr; gmx mdrun -v -deffnm nvt-50K; gmx grompp -f npt.mdp -c npt-298K.gro -p topol.top -o npt.tpr; gmx mdrun -v -deffnm npt &>data &.</pre>
Dinâmica	<pre>gmx grompp -f md.mdp -c npt.gro - p topol.top -o md.tpr; gmx mdrun -v -deffnm md&>data&.</pre>

Energia Potencial	<code>gmx energy -f md.edr -o energiatotal.xvg</code>
Interação Proteína-Proteína X Interação Proteína-Solvente	<code>gmx_mpi_d_hbond -f md.trr -s md.tpr -num prot-prot - life prot-prot-life -dist prot-prot-dist</code> <code>xmgrace prot-prot.xvg.</code> <code>gmx_mpi_d_hbond -f md.trr -s md.tpr -num prot-prot - life prot-prot-life -dist prot-prot-dist -hx prot-prot-helix</code> <code>xmgrace prot-sol.xvg.</code>
Helicidade por resíduo	<code>gmx helix -f trajout.xtc -s md.tpr;</code> <code>xmgrace helicity.xvg</code>
Giros por resíduo	<code>gmx_mpi_d_gyrate -f md.trr -s md.tpr</code>