

PLANEJAMENTO RACIONAL DE INIBidores DA ENZIMA β -SECRETASE NA DOENÇA DE ALZHEIMER

MARIANA GALLIO FRONZA¹; FREDERICO SCHIMMITI KREMER²; LUCIANO PINTO²; LUCIELLI SAVEGNAGO¹

¹ Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia – GPN, Universidade Federal de Pelotas – nanaa.fronza@gmail.com; luciellisavegnago@yahoo.com.br

² Laboratório de Proteômica e Bioinformática – Universidade Federal de Pelotas

1. INTRODUÇÃO

A β -secretase é uma enzima que faz a clivagem da proteína precursora amielóide (APP) formando o peptídeo β -amilóide que é insolúvel e tóxico aos neurônios, (KUMAR et al., 2015). O β -amilóide é o principal componente das placas senis encontradas na Doença de Alzheimer, que por sua vez também desencadeia outros eventos característicos dessa patologia como a hiperfosforilação da proteína TAU e o estresse oxidativo (KURZ e PERNECZKY, 2011). Esses fatores elegem o peptídeo β -amilóide como um importante alvo terapêutico para a doença de Alzheimer (MIKULCA et al., 2014).

Atualmente os fármacos utilizados para o tratamento do Alzheimer são apenas capazes de atenuar o déficit cognitivo (COLE e VASSAR, 2007) tornando o desenvolvimento de inibidores da β -secretase um grande passo no tratamento dessa patologia (MENTING e CLAASSEN, 2014).

Porém, grande parte desses inibidores não atravessam a barreira hematoencefálica devido ao seu tamanho ou não possuem uma boa interação com o seu sítio ativo (YAN e VASSAR, 2014). Para isso têm se utilizado ferramentas de bioinformática para predizer a ligação de moléculas com a proteína alvo como a Docagem Molecular (SEMIGHINI, 2014) e também para analisar propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) (HONÓRIO et al., 2012).

Sendo assim o objetivo do estudo foi, dentre mais de 35 milhões de compostos, selecionar uma classe com potencial para inibir a enzima β -secretase e que apresentem propriedades farmacológicas através de análises *in silico*.

2. METODOLOGIA

O alvo do nosso trabalho foi a enzima β -secretase em pH 5.0 (PDB 2ZHU) pois apresenta preferência por ambientes com caráter ácido para desempenhar sua atividade (VENUGOPAL et al., 2008). Nesse sentido, selecionou-se o aspartato 228 e o aspartato 32 que são os aminoácidos mais conservados do sítio ativo dessa enzima e estão mais disponíveis para ligações na conformação ativa da aspartase, facilitando assim sua inibição (POLGAR e KESERU, 2005).

Sendo assim, relacionou-se o sítio ativo da β -secretase à docagem molecular com um banco de dados de mais de 35 milhões de compostos - ZINC (IRVIN e SHOICHET, 2005), para encontrar um padrão nos compostos que poderiam interferir nessa enzima. Obteve-se como resultado mil compostos e então discutiu-se a possibilidade de síntese selecionando 76 compostos com algumas alterações.

Para predizer a ligação dos 76 compostos selecionados foi utilizado o software de Docagem Molecular, AutoDock Vina, pois apresenta uma maior velocidade e acurácia entre os já descritos até então (Trott e Olson, 2010). Além disso, foi transformado o sítio ativo da enzima móvel para uma maior aproximação do meio ambiente real (ABREU et al., 2012) e utilizando uma grid box: centro_x = 64,817 centro_y = 47,35 centro_z = -0,206 e tamanho_x = 34 tamanho_y = 36 tamanho_z = 62.

Para observar a seletividade, foi realizada a docagem molecular dos compostos selecionados na enzima β -secretase – 2 que possui uma homologia

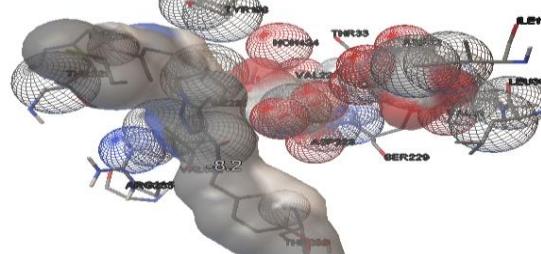
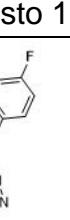
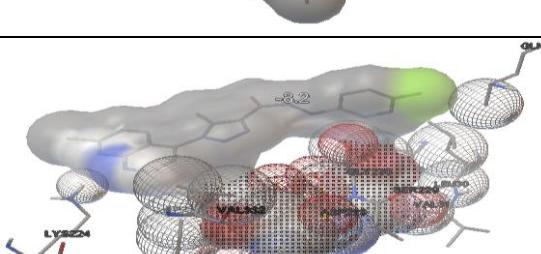
de cerca de 75% com a β -secretase, porém não desencadeia a produção excessiva de β -amilóide (READ e SUPHIOGLU, 2013). Para isso utilizou-se uma grid box: centro_x= 0,222, centro_y= -1,444, centro_z= 0,361 e tamanho_x= 42, tamanho_y= 62 e tamanho_z= 26 pois abrange principalmente a área do seu sítio ativo, o Aspartato 48 e o Aspartato 241 (MIRSAFIAN et al., 2014).

As interações entre a proteína e o ligante foram avaliadas a partir dos melhores resultados na docagem molecular, usando o software Discovery Studio 4.1 Visualizer (BIOVIA, 2015) para predizer contato com aminoácidos e ligações, como pontes de Hidrogênio. Para predizer os parâmetros de ADME foi utilizado o software QikProp 4.4 (SCHRÖDINGER, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos compostos submetidos a docagem molecular, dois tiveram um melhor desempenho na interação com a β -secretase, indicado pelo score (tabela 1). Sabe-se que quanto menor esse valor, menor a quantidade de energia utilizada na formação desse complexo.

Tabela 1: Estrutura e o resultado das duas moléculas que tiveram melhor desempenho na docagem molecular, sua melhor conformação e os aminoácidos em possível contato.

Compostos	Score (kcal/mol)	Conformação e resíduos próximos
 Composto 1	-8,2 kcal/mol	
 Composto 2	-8,2 kcal/mol	

Na figura 1 é possível observar as interações feitas entre o ligante e o receptor, inclusive a formação de pontes de Hidrogênio entre os compostos e o Aspartato 228, componente do sítio ativo da enzima, indicando uma provável interacão.

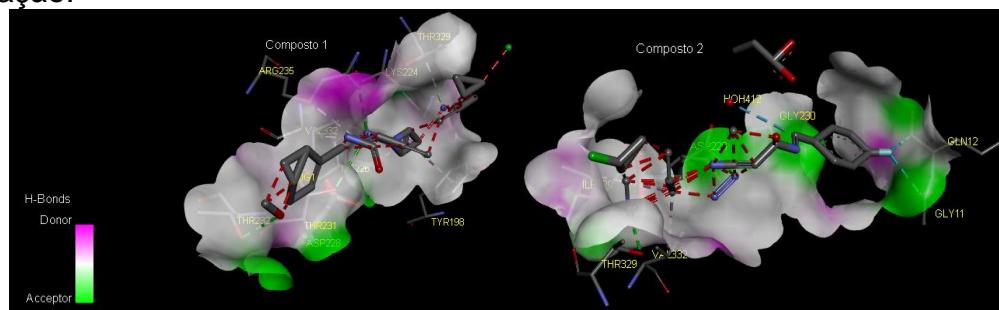


Figura 1: Interações entre os compostos e o sítio ativo da enzima β -secretase, em verde indicando as pontes de Hidrogênio acceptoras e em roxo as doadoras.

A docagem molecular utilizando o sítio ativo da β -secretase 2 não teve resultados relevantes, sugerindo seletividade dos compostos testados.

Dentre as propriedades farmacocinéticas relevantes analisou-se o peso molecular, número de pontes de hidrogênio receptoras e doadoras, o LogP (água\octanol) e a superfície polar, características necessárias para a formulação de fármacos (LIPINSKI et al., 2001). Foi analisado também, a taxa de ligação em proteínas plasmáticas, o número de metabólitos primários, a permeabilidade celular, capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, atividade no sistema nervoso central preditiva e a taxa de absorção pela via oral. Como resultado, os dois compostos se enquadram na classificação de Lipinski e possuem comportamento similar. É válido ressaltar que, o composto 2 é melhor absorvido oralmente (80%) e possui cerca de 25% de chances a mais em relação ao composto 2(50%) de ter ação no sistema nervoso central, provavelmente por ultrapassar a barreira hematoencefálica mais facilmente.

Os dois compostos selecionados pertencem a classe Quinolinotriazoloil Carboxibenzilamida e possuem um núcleo heterocíclico em sua estrutura. Atualmente mais de 40 milhões de compostos tem estrutura heterocíclica (MELO et al., 2006) e já demonstraram diversas atividades farmacológicas como antioxidante (POKURI et al., 2014) e neuroprotetora (CHILUMURI et al., 2013).

4. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos conclui-se que tanto o composto 1 quanto o composto 2 possivelmente possuem a capacidade de inibir a β -secretase. Porém são necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* para afirmar que são promissores fármaco para o tratamento da Doença de Alzheimer.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, R. M. V.; FROUFE, H. J. C.; QUEIROZ, M. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Selective Flexibility of Side-Chain Residues Improves VEGFR-2 Docking Score using AutoDock Vina. **Chemical Biology e Drug Design**, v.79, c.4, p.530-534, 2012.
- BIOVIA Dassault Systèmes, Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.5, San Diego: Dassault Systèmes, 2015.
- CHILUMURI, A.; ODELL, M.; MILTON, NG. Benzothiazole aniline tetra(ethylene glycol) and 3-amino-1,2,4-triazole inhibit neuroprotection against amyloid peptides by catalase overexpression *in vitro*. **ACS Chemical Neuroscience**, Londres, v.4, n.11, p. 1501-1512, 2013.
- COLE, S. L.; VASSAR, R. The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. **Molecular Neurodegeneration**, Chicago, v. 2, p. 1-22, 2007.
- HONÓRIO, K.M.; MODA, T.L.; ANDRICOPULO, A.D. Pharmacokinetic properties and *in silico* ADME modeling in drug discovery. **Medicinal Chemistry**, Santo André, v.9, c.2, p. 163-176, 2013.
- IRWIN, J.J.; SHOICHET, B.K. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. **Journal of Chemical information and modelling**, California, v.45, c.1, p. 177-182, 2005.
- KUMAR, A.; EKAVALI, A.S. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, Chandigarh, v.67, n.2, p. 195-203, 2015.

KURZ, A.; PERNECZKY, R. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, Munique, v.35, c.2, p. 373-379, 2011.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Groton, v. 46, n.3, p. 3-26, 2001.

MEENTING, K.W.; CLAASSEN, J. A. H. R. β -secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. **Frontiers in aging neuroscience**, Gelderland, v.6, c.165, p. 1-9, 2014.

MELO, J.O.F.; DONNICI, L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V.; FERREIRA, M.L.G.; CUNHA, A.C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Scielo**, São Paulo, v.29, n.3, p. 569-579, 2006.

MIKULCA, J.A.; NGUYEN, V.; GAJDOSIK, D.A.; TEKLU, S.G.; GIUNTA, E.A.; LESSA, E.A.; TRAN, C.H.; TERAK, E.C.; RAFFA, R.B. Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II. Update on secretase inhibitors and related approaches. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, Filadelfia, v.39, c.1, p. 25-37, 2014.

MIRSAFIAN, H.; RIPEN, M.; MERICAN, A.F.; MOHAMAD, B. Amino acid sequence and structural comparison of BACE1 and BACE2 using evolutionary trace method. **Scientific World Journal**, v.2014, p.1-6, 2014.

POLGAR, T.; KESERU, G.M. Virtual screening for beta-secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at Asp32 and Asp228. **Journal of medicinal Chemistry**, Budapest, v.2, c.48, p.3749-3755, 2005.

READ, J.; SUPHIGOLU,C. Dropping the BACE:Beta Secretase (BACE1) as an Alzheimer's Disease Intervention Target. **Neurodegenerative Disease**, 2013.

SCHRÖDINGER. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-2: QikProp, version 4.4, LLC, Nova Iorque, 2015.

SEMIGHINI, E.P. *In Silico* Design of Beta-Secretase Inhibitors in Alzheimer's Disease. **Chemical Biology and drug design**, Ribeirão Preto, p. 1-7, 2014.

Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational Chemistry**, California v.31, c.2, p.455-461, 2010

VENUGOPAL, C.; DEMOS, C.V.; RAO, K.S.; PAPPOLLA, M.A.; SAMBAMURTI, K. Beta-secretase: structure, function, and evolution. **CNS Neurological Disorders Drug Targets**, Carolina do Sul, v.7, c.3, p. 278-289, 2008.

YAN, R.; VASSAR, R. Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease **Lancet Neurology**, Chicago, v.13, c.3, p. 1-22, 2014.

therapy. **Lancet Neurology**, Chicago, v.13, c.3, p. 1-22, 2014.