



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



DEYSE BRITO BARBOSA

PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE INIBIDORES TRIPLOS
FRENTE A ACETILCOLINESTERASE,
BUTIRILCOLINESTERASE E BETA-SECRETASE 1

Feira de Santana

2025

DEYSE BRITO BARBOSA

**PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE INIBIDORES TRIPLOS
FRENTE A ACETILCOLINESTERASE,
BUTIRILCOLINESTERASE E BETA-SECRETASE 1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Franco Henrique Andrade Leite

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Batista de Carvalho

Feira de Santana

2025

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Barbosa, Deyse Brito

B196p Planejamento e avaliação de inibidores triplos frente a Acetilcolinesterase, Butirilcolinesterase e Beta-secretase 1./ Deyse Brito Barbosa.– 2025.
165f.: il.

Orientador: Franco Henrique Andrade Leite

Coorientador: Paulo Batista de Carvalho

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2025.

1.Doença de Alzheimer. 2.Compostos multialvos. 3.Reposicionamento de fármacos. 4.Acetilcolinesterase (AChE). 5.Butirilcolinesterase (BuChE). 6.Beta-secretase 1 (BACE-1). I.Leite, Franco Henrique Andrade, orient. II.Carvalho, Paulo Batista de, coorient. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.Título.

CDU: 616.831

Maria de Fátima de Jesus Moreira - Bibliotecária - CRB-5/1120

DEYSE BRITO BARBOSA

**“Planejamento de inibidores triplos frente à acetilcolinesterase,
butirilcolinesterase e beta-secretase 1”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 30 de Junho de 2025.

Orientador: Prof. Dr. **Franco Henrique Andrade Leite**
UEFS

Membra: Prof^a. Dr^a. **Marcela Cristina de Moraes**
UFF

Membro: Prof. Dr. **Gildomar Lima Valasques Júnior**
UESB


Membra: Prof^a. Dr^a. **Alessandra Mendonça Teles de Souza**
UFRJ

Membro: Prof. Dr. **André Lacerda Braga Teles**
UNEB

A Deus.

AGRADECIMENTOS

De tantas páginas escritas, talvez essa seja a mais difícil. Não pela ausência de motivos, mas pela dificuldade em traduzir tamanha gratidão que me atravessa ao concluir esse ciclo.

Agradeço primeiramente a Deus, por ser minha fonte de sabedoria, resiliência, coragem e a paz necessária para trilhar os caminhos percorridos até aqui, bem como pela segurança em saber que jamais estarei sozinha.

Aos meus pais, Antonio e Gecilda, meu maior privilégio e sorte! Obrigada pelo esforço desmedido em prol do meu crescimento, pelo amor incondicional, por me impulsionarem a ir longe, mas sempre com a certeza de que tenho um lugar seguro para onde posso voltar. Ao meu irmão Diego, pela amizade e por sempre acreditar no meu potencial. A Victor, por tornar os meus dias mais leves, me incentivar e (tentar) me ensinar a não pensar demais. Amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Franco Andrade, obrigada por plantar sonhos que eu nem sabia ter! Por toda a empolgação com a pesquisa, pelo conhecimento compartilhado, paciência, apoio e colaboração, por ser também amigo e incentivador.

Ao meu coorientador, Prof. Paulo Carvalho, por abrir os caminhos tão temidos da síntese orgânica, por toda a dedicação ao projeto, por me receber tão gentilmente em seu laboratório, na UIW e em San Antonio. Estendo os agradecimentos a Silvia Carvalho, que se tornou uma grande amiga e parceira de aventuras.

Aos amigos do LaqBio, em especial Gécica e Bruno, pela parceria nessa jornada que nos ensina a importância de compartilhar – saberes, dores e alegrias – e a aproveitar cada etapa, mesmo nos dias difíceis. A Anna, Gabriela, Janay, Jhersyka, Larissa, Mayra, Paula e Sara, por, em suas particularidades, serem a combinação perfeita de acolhimento e diversão. A Thiago, obrigada por me ajudar a enxergar quão grande o meu mundo pode ser.

À University of the Incarnate Word, por me aceitar para realização do doutorado sanduíche e por todo suporte ao projeto. Ao professor Manoelito Coelho, por disponibilizar o LMM para as análises computacionais; à professora Mariana Botura, pelo treinamento e recursos disponibilizados para os testes frente às colinesterases; ao professor Victor Diógenes e ao Lucas, ao professor Bruno Andrade e ao grupo Alzheimer FAPEMIG, pela colaboração na pesquisa. À UEFS/PPGBiotec pelo apoio institucional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença crônica neurodegenerativa multifatorial que afeta majoritariamente a população idosa. Apesar dos impactos na qualidade de vida dos pacientes, os tratamentos disponíveis apresentam eficácia limitada, tornando urgente a busca por novos fármacos. Nesse sentido, compostos multialvos capazes de inibir simultaneamente enzimas como acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BuChE) e beta-secretase 1 (BACE-1) têm se mostrado promissores. O reposicionamento de fármacos é uma estratégia eficaz nesse cenário. Triagens virtuais anteriores identificaram silodosina, fármaco aprovado pelo FDA para tratamento de distúrbios urológicos, como potencial inibidor triplo da DA (QFIT=31,67; Pontuação_{AChE}=-8,0 kcal/mol; Pontuação_{BuChE}=-8,1 kcal/mol; Pontuação_{BACE-1}=-43,55). Este estudo avaliou silodosina e derivados por meio de ensaios *in vitro* e simulações de dinâmica molecular (DM). Silodosina demonstrou segurança em concentrações inferiores a 10µM, baixo potencial de inibição de AChE (IC₅₀ > 500µM) e atividade satisfatória frente a BuChE e BACE-1. As simulações corroboraram esses achados, revelando maior estabilidade dos complexos com BuChE e BACE-1. A modelagem de novos derivados resultou em compostos com maior afinidade frente à AChE, destacando modificações como a simplificação da cadeia conectora e a introdução de substituintes polares e menores. O derivado S23 apresentou perfil promissor (Pontuação_{AChE}=-9,8kcal/mol; Pontuação_{BuChE}=-7,7kcal/mol; Pontuação_{BACE-1}=39,74) e foi priorizado para síntese e avaliação. Os dados obtidos reforçam a viabilidade da abordagem multialvo e contribuem para o avanço no desenvolvimento de candidatos terapêuticos contra a DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Compostos multialvos. Reposicionamento de fármacos. Acetilcolinesterase (AChE). Butirilcolinesterase (BuChE). Beta-secretase 1 (BACE-1).

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial neurodegenerative chronic disorder that primarily affects the elderly. Despite impacts in patients' life, current pharmacological treatments show limited efficacy, highlighting the urgent need for new therapeutic options. For this reason, multi-target compounds capable of simultaneously inhibiting key enzymes such as acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BuChE), and beta-secretase 1 (BACE-1) have emerged as promising candidates and, in regard of multitarget identification, drug repurposing has proven to be an effective strategy. Previous virtual screening identified silodosin, an FDA-approved drug for treat urological conditions, as a potential triple inhibitor for AD treatment (QFIT=31.67; Score_{AChE}=-8.0kcal/mol; Score_{BuChE}=-8.1kcal/mol; Score_{BACE-1}=-43.55). This study evaluated silodosin and its derivatives using *in vitro* assays and molecular dynamics (MD) simulations. Silodosin was shown to be safe at concentrations below 10 μ M, with low AChE inhibition (IC₅₀>500 μ M) but satisfactory activity against BuChE and BACE-1. MD simulations confirmed these findings, revealing greater complex stability with BuChE and BACE-1. Rational design of new derivatives led to improved AChE affinity, with structural modifications such as simplification of the linker chain and introduction of smaller substituents. Derivative S23 demonstrated a promising binding profile (Score_{AChE} =-9.8kcal/mol; Score_{BuChE}=-7.7kcal/mol; Score_{BACE-1}=-39.74) and was selected for synthesis and further evaluation. These findings support the viability of the multi-target approach and contribute to the development of new therapeutic candidates for AD.

Key-words: Alzheimer Disease. Multitarget compounds. Drug repurposing. Acetylcholinesterase (AChE). Butyrylcholinesterase (BuChE). Beta-secretase 1 (BACE-1).

LISTA DE ABREVIACES

β A	Peptdeo β -amiloide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BuChE	Butirilcolinesterase
ChAT	Colina Acetiltransferase
DA	Doença de Alzheimer
DM	Dinâmica Molecular
DTNB	cido 5-tio-2-nitrobenzoico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IC50	Concentra Inibitria Média
MM/PBSA	<i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
PDB	<i>Protein DataBank</i>
PPA	Proteína Precursora Amiloide
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da síntese de acetilcolina	18
Figura 2	Sítio ativo de AChE (PDB ID: 4M0E) e BuChE (PDB ID: 4BDS).	20
Figura 3	Representação esquemática do mecanismo catalítico da BACE-1.	22
Figura 4	Tratamentos disponíveis para a DA.	23
Figura 5	Representação esquemática do acoplamento molecular	27
Figura 6	A) Silodosina (Pontuação _{AChE} = -8,0 kcal/mol; Pontuação _{BuChE} = -8,1 kcal/mol; Pontuação _{BACE-1} = 43,55) e (B) estrutura de partida para os derivados da Silodosina.	34
Figura 7	Esquema proposto para síntese de S23	38
Figura 8	Efeito da silodosina na viabilidade de células PC12 determinado através de MTT.	43
Figura 9	Efeito da silodosina na atividade enzimática de BACE-1 em células PC12 determinado por ensaio celular (KIT MAK237).	44
Figura 10	Curva concentração-resposta do efeito anticolinesterásico <i>in vitro</i> de silodosina frente à BuChE	46
Figura 11	RMSD para a cadeia principal (<i>backbone</i>) durante as trajetórias das simulações de DM dos sistemas de AChE (A – APO; B – complexo), BuChE (C – APO; D – complexo), e BACE-1 (E – APO; F – complexo)	48
Figura 12	RMSF (Å) (<i>backbone</i>) de AChE nas formas APO e complexada com silodosina durante a fase produtiva ($\Delta t = 35\text{ns}$).	50
Figura 13	RMSF (Å) (<i>backbone</i>) de BuChE nas formas APO e complexada com silodosina durante a fase produtiva ($\Delta t = 75\text{ns}$).	50
Figura 14	RMSF (Å) (<i>backbone</i>) de BACE-1 nas formas APO e complexada com silodosina durante a fase produtiva ($\Delta t = 75\text{ns}$).	51

Figura 15	Permanência das interações de hidrogênio da silodosina no sítio ativo de AChE, BuChE e BACE-1 durante a fase produtiva das simulações de DM e identificação dos pares envolvidos.	52
Figura 16	Interações da silodosina no sítio ativo de AChE obtido da estrutura representativa da simulação de DM (t = 190,45 ns).	54
Figura 17	Interações da silodosina no sítio ativo de BuChE obtido da estrutura representativa da simulação de DM (t = 85,25 ns).	55
Figura 18	Interações da silodosina no sítio ativo de BACE-1 obtido da estrutura representativa da simulação de DM (t = 88,3 ns).	56
Figura 19	Decomposição por resíduo da energia livre de ligação para o complexo AChE-silodosina, calculado usando o método MM/PBSA durante a fase produtiva ($\Delta G < -0,2$ kcal/mol)	58
Figura 20	Decomposição por resíduo da energia livre de ligação para o complexo BuChE-silodosina, calculado usando o método MM/PBSA durante a fase produtiva ($\Delta G < -0,1$ kcal/mol).	59
Figura 21	Decomposição por resíduo da energia livre de ligação para o complexo BACE-1-silodosina, calculado usando o método MM/PBSA durante a fase produtiva ($\Delta G < -0,3$ kcal/mol)	60
Figura 22	Representação esquemática das regiões que sofreram alterações no planejamento de derivados de silodosina.	61
Figura 23	Representação em 2D do derivado S23.	64
Figura 24	Representação das interações intermoleculares de S23 (Pontuação = -9,8 kcal/mol) no sítio ativo de AChE.	65
Figura 25	Representação das interações intermoleculares de S23 (Pontuação = -7,7 kcal/mol) no sítio ativo de BuChE.	66
Figura 26	Representação das interações intermoleculares de S23 (Pontuação = 39,74) no sítio ativo de BACE-1.	67
Figura 27	RMSD para a cadeia principal (<i>backbone</i>) durante as trajetórias de simulações de DM dos sistemas de (A) AChE, (B) BuChE e (C) BACE-1 complexadas com INT4.	70

Figura 28	RMSF (Å) (<i>backbone</i>) de AChE nas formas APO e complexada com INT4 durante a fase produtiva ($\Delta t = 40\text{ns}$).	71
Figura 29	RMSF (Å) (<i>backbone</i>) de BuChE nas formas APO e complexada com INT4 durante a fase produtiva ($\Delta t = 40\text{ns}$).	72
Figura 30	RMSF (Å) (<i>backbone</i>) de BACE-1 nas formas APO e complexada com INT4 durante a fase produtiva ($\Delta t = 40\text{ns}$).	72
Figura 31	Interações de INT4 no sítio ativo de AChE obtido da estrutura representativa da simulação de DM ($t = 83,9\text{ ns}$).	73
Figura 32	Interações de INT4 no sítio ativo de BuChE obtido da estrutura representativa da simulação de DM ($t = 79,9\text{ ns}$).	74
Figura 33	Interações de INT4 no sítio ativo de BACE-1 obtido da estrutura representativa da simulação de DM ($t = 51,9\text{ ns}$).	75
Figura 34	Representação esquemática de requisitos estruturais para inibição simultânea de AChE, BuChE e BACE-1.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estrutura química de novos derivados de silodosina.	35
Tabela 2	Energia livre de ligação e componentes calculados pelo g_mmpbsa.	57
Tabela 3	Afinidade dos derivados de silodosina frente a AChE, BuChE e BACE-1 em simulações de acoplamento molecular.	62
Tabela 4	Avaliação <i>in vitro</i> dos intermediários da síntese de S23.	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	DOENÇA DE ALZHEIMER	17
3.1.1	Hipótese colinérgica	18
3.1.1.1	Colinesterases	19
3.1.2	Hipótese amiloide	20
3.1.2.1	Beta-secretase 1	21
3.2	TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER	22
3.3	IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS	25
3.3.1	Estratégias <i>in silico</i> para identificação de moléculas bioativas	25
3.3.2	Estratégias <i>in vitro</i> para avaliação de atividade biológica	28
3.3.3	Planejamento de novos derivados	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR	31
4.2	ENSAIOS CELULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-BACE-1	31
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA	32
4.4	PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DA SILODOSINA	33
4.4.1	Planejamento de derivados da silodosina	33
4.4.1.1	Simulações de Dinâmica Molecular	33
4.4.1.2	Planejamento de derivados da silodosina	34
4.4.1.3	Priorização do derivado da silodosina	36
4.4.2	Síntese do derivado da silodosina priorizado	37
4.4.3	Avaliação dos produtos de síntese do derivado S23	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR	42
5.2	ENSAIOS CELULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-BACE-1	44
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA	45

5.4	PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DA SILODOSINA	47
5.4.1	Planejamento de derivados da silodosina	47
5.4.1.1	Simulações de dinâmica molecular	47
5.4.1.2	Planejamento dos derivados da silodosina	60
5.4.1.3	Priorização do derivado da silodosina	62
5.4.3	Avaliação dos produtos de síntese do derivado S23	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN ¹H E ¹³C DOS PRODUTOS DE SÍNTESE DO DERIVADO S23	94
	APÊNDICE A.1 Espectro de RMN ¹ H do 3-bromopropil benzoato (INT1)	94
	APÊNDICE A.2 Espectro de RMN ¹³ C do 3-bromopropil benzoato (INT1)	95
	APÊNDICE A.3 Espectro de RMN ¹ H do 3-(5-bromoindolin-1-il)propil benzoato (INT2)	96
	APÊNDICE A.4 Espectro de RMN ¹³ C do 3-(5-bromoindolin-1-il)propil benzoato (INT2)	97
	APÊNDICE A.5 Espectro de RMN ¹ H do 3-(5-(6-bromohex-1-in-1-il)indolin-1-il)propil benzoato (INT3)	98
	APÊNDICE A.6 Espectro de RMN ¹³ C do 3-(5-(6-bromohex-1-in-1-il)indolin-1-il)propil benzoato (INT3)	99
	APÊNDICE A.7 Espectro de RMN ¹ H do 3-(5-(6-bromohexil)indolin-1-il)propil benzoato (INT4)	100
	APÊNDICE A.8 Espectro de RMN ¹³ C do 3-(5-(6-bromohexil)indolin-1-il)propil benzoato (INT4)	101
	APÊNDICE B – GRÁFICOS DE IC50 DOS PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA SÍNTESE DO DERIVADO S23	102
	ANEXO A – DEPÓSITO DE PATENTE INTITULADA “USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER”	104

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença crônica neurodegenerativa que afeta o cérebro de maneira progressiva, e está associada a declínio cognitivo, perda de memória, limitações em executar atividades cotidianas e alterações comportamentais (Mostafa; Disouky; Lazarov, 2025; Mubonanyikuzo *et al.*, 2025). A DA é responsável por aproximadamente 70% dos casos de demência em todo o mundo (World Health Organization, 2025).

Diante do significativo impacto epidemiológico, a elucidação dos aspectos relacionados à doença tem sido amplamente explorada. No entanto, a patogênese ainda não foi completamente esclarecida e, diversas hipóteses têm sido propostas com o intuito de explicar os mecanismos da DA, dentre as quais destacam-se a hipótese colinérgica e a hipótese amiloide (Chen, 2018; Sakata, 2018). A hipótese colinérgica está associada a alterações na atividade colinérgica em decorrência da redução dos níveis de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, os quais são regulados pela ação catalítica das colinesterases – acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, E.C. 3.1.1.8) –, responsáveis pela hidrólise do neurotransmissor em circunstâncias normais (Bekdash, 2021; Chen *et al.*, 2022). Por esse motivo, a inibição das colinesterases tem se mostrado útil no tratamento sintomático de indivíduos com DA.

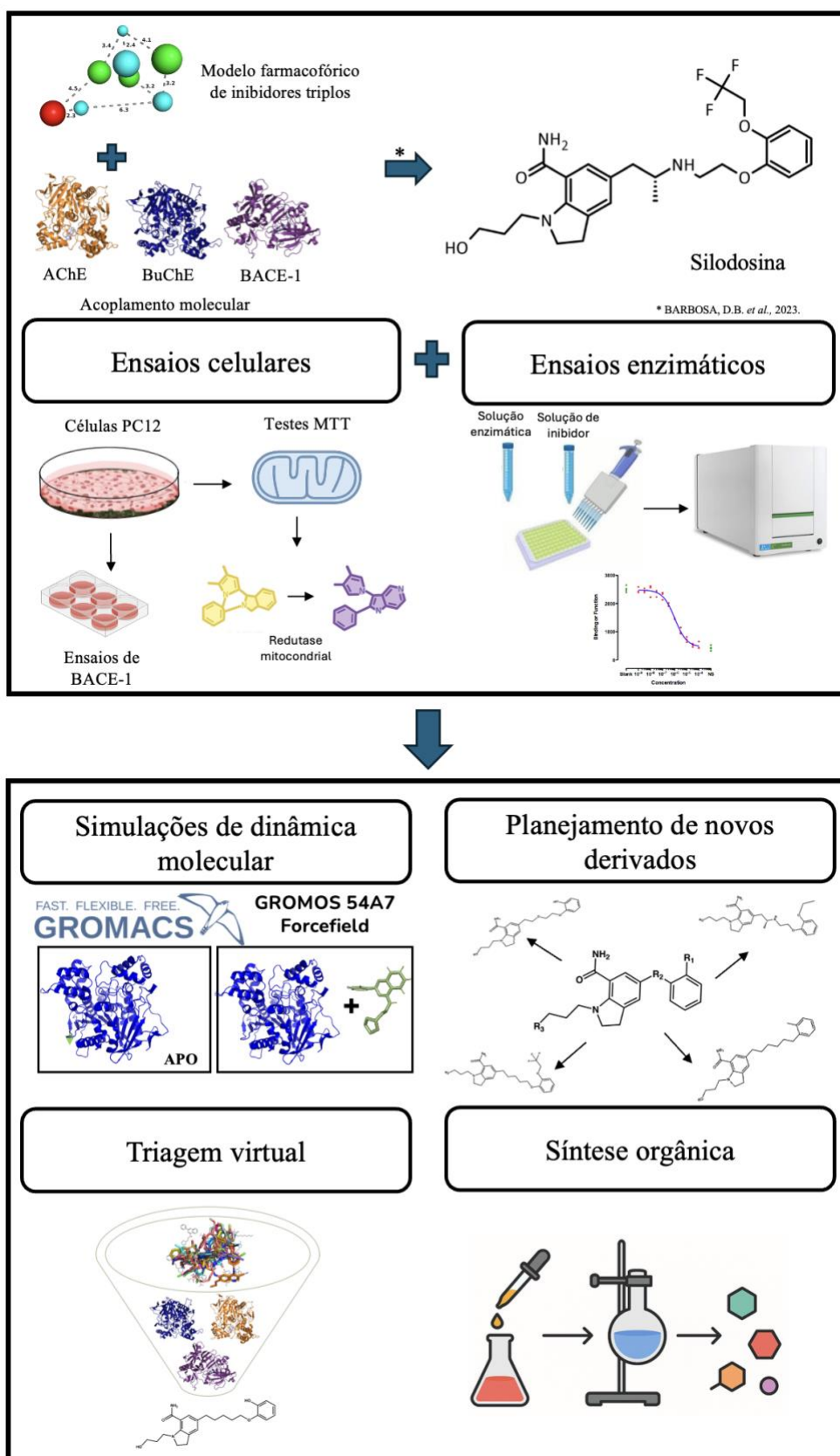
A hipótese amiloide, por sua vez, está associada ao acúmulo de peptídeos β -amiloide (β A) insolúveis no cérebro (Garbuz; Zatsepina; Evgen'ev, 2021). Os peptídeos β A são formados a partir da proteólise da proteína precursora amiloide (PPA) sob ação de enzimas proteolíticas (alfa, beta e gama secretase), sendo que a principal secretase envolvida na formação do peptídeo β A é a beta-secretase 1 (BACE-1, E.C. 3.4.23.46) pela via amiloidogênica (Garbuz; Zatsepina; Evgen'ev, 2021; Kurkinen *et al.*, 2023). Por essa via, a PPA é hidrolisada pela BACE-1 e produz fragmentos peptídicos que são posteriormente clivados pela gama secretase. Esse processo leva à formação dos peptídeos β A, os quais podem formar aglomerados que se depositam no ambiente extracelular do tecido neuronal e promovem disfunção sináptica progressiva, neurodegeneração e morte neuronal.

No entanto, apesar das descobertas acerca dos mecanismos que envolvem a DA, ainda não estão disponíveis fármacos seguros capazes de prevenir e/ou retardar as alterações cognitivas associadas à doença (Elmaleh *et al.*, 2019). As falhas na pesquisa e desenvolvimento de fármacos para o tratamento da DA estão associadas, na maioria dos casos, ao fato de muitos desses estudos desconsiderarem a pluralidade de fatores etiológicos associados à DA e enfatizam mecanismos

específicos (Gong; Liu; Iqbal, 2018). Em casos de doenças multifatoriais como a DA, a abordagem apropriada consiste no desenvolvimento de fármacos multialvos, ou seja, capazes de modular simultaneamente mais de um alvo terapêutico e/ou sintoma da doença (Kashyap *et al.*, 2020; Kumar; Saha; Roy, 2023).

O uso de fármacos multialvos tem apresentado resultados positivos para tratamento de doenças complexas como câncer, doenças metabólicas, cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Ryszkiewicz; Malinowska; Schlicker, 2025). No entanto, a identificação de compostos com essa característica consiste em um processo desafiador. Com o objetivo de otimizar o processo, a indústria farmacêutica tem utilizado do reposicionamento de fármacos como uma alternativa, na qual fármacos previamente aprovados por agências regulatórias para doenças conhecidas são reposicionados para novas indicações (Parvathaneni *et al.*, 2019). O desenvolvimento de novas ferramentas computacionais e de biotecnologia tem recebido destaque nessa área, visando alavancar triagens com compostos já conhecidos. Adicionalmente, a identificação de fármacos passíveis de reposicionamento por triagem virtual, em associação ao uso das estratégias clássicas adotadas para identificação de atividade biológica como ensaios *in vitro* e análises *in silico*, pode ser útil para direcionar o planejamento de novos compostos com atividade biológica e potencial multialvo otimizada.

Por esse motivo, a integração de técnicas virtuais foi aplicada em um estudo anterior (Barbosa *et al.*, 2023) e resultou na identificação do fármaco silodosina (ZINC ID 3806063) – um fármaco aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de hiperplasia prostática benigna – como um potencial inibidor triplo frente AChE, BuChE e BACE-1. Nesse estudo, silodosina foi submetida a análises de neurotoxicidade para identificação de viabilidade celular bem como foram realizados ensaios *in vitro* para identificação de atividade biológica de silodosina frente AChE, BuChE e BACE-1, e os resultados descritos estão contidos em patente depositada (Processo BR 10 2024 023762 5, Anexo A). Adicionalmente, simulações de dinâmica molecular foram empregadas para guiar o planejamento de novos derivados com potencial atividade multialvo. Os derivados propostos foram submetidos a uma nova rotina de triagem virtual para seleção e síntese do derivado mais promissor, o qual foi devidamente avaliado frente aos alvos de interesse (Esquema 1).



Esquema 1. Representação esquemática das etapas desenvolvidas durante o estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar novos inibidores triplos frente a acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e beta-secretase 1 humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial neurotóxico de potenciais inibidores triplos;
- Avaliar a atividade enzimática de potenciais inibidores triplos frente a acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e beta-secretase 1;
- Desenvolver modelos de interação ligante-macromolécula que considerem a flexibilidade conformacional do ligante e da proteína;
- Propor novos derivados com base nos requisitos estéreo-eletrônicos para inibição tripla;
- Sintetizar novos candidatos a inibidores triplos;
- Calcular o valor de IC₅₀ da silodosina e derivados frente às colinesterases.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) é uma síndrome caracterizada por declínio cognitivo e neurodegeneração progressiva (MURDOCK; TSAI, 2023; PENG; BESTARD-LORIGADOS; SONG, 2022). A DA corresponde à forma mais comum de demência ao redor do mundo e é a principal causa de declínio cognitivo em idosos (World Health Organization, 2025).

A progressão da doença pode ser caracterizada em três fases: *pré-clínica*, quando os indivíduos começam a apresentar alterações cerebrais mensuráveis, porém nenhum sintoma; *prodrômica* (também conhecida como fase de comprometimento cognitivo leve), caracterizada por sintomas cognitivos súbitos, como dificuldades de memória e linguagem, mas com pouco ou nenhum impacto nas atividades cotidianas; e *demência*, estágio caracterizado por sintomas cognitivos e comportamentais associados a biomarcadores cerebrais associados à DA (Alzheimer's Association, 2023; Eisenmenger *et al.*, 2023).

Aproximadamente 7 milhões de indivíduos acima de 65 anos convivem com DA nos Estados Unidos, dos quais a percentagem de casos aumenta com o envelhecimento (Alzheimer's Association, 2023). No Brasil, a demência por DA corresponde à principal causa de óbito relacionado à demência (78,3%) (Brasil *et al.*, 2024), tendo sido observada uma tendência crescente na mortalidade por DA em todas as macrorregiões do país (Paschalidis *et al.*, 2023). A nível mundial, a DA é considerada a causa de demência mais importante em idosos – 80% dos casos –, o que corresponde a mais de 35 milhões de indivíduos (Bringas *et al.*, 2020; Chandra; Sisodia; Vassar, 2023; Self; Holtzman, 2023). Apenas 5% dos casos são determinados por condições genéticas, os quais são observados em indivíduos com idade inferior a 65 anos, e estão relacionados a uma apresentação autossômica dominante caracterizada por alterações em genes envolvidos no metabolismo amiloide (Wijeratne *et al.*, 2023).

Por outro lado, a maioria dos casos ocorre em indivíduos acima de 65 anos, os quais apresentam diversos fatores de risco (além da idade), como por exemplo danos cerebrais, depressão, estilo de vida e predisposição genética (Wijeratne *et al.*, 2023). Apesar de os eventos clínicos associados à DA estarem descritos, a causa e a patofisiologia ainda não foram completamente elucidadas. Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar o desenvolvimento

da DA, e as observações histoquímicas de deposição de placas amiloides, neuroinflamação, níveis reduzidos de neurotransmissores, atrofia cerebral e perda dos neurônios colinérgicos desempenham um papel importante na compreensão da doença (Eisenmenger *et al.*, 2023; Self; Holtzman, 2023).

3.1.1 Hipótese colinérgica

A hipótese colinérgica corresponde a uma das primeiras hipóteses propostas para explicar a patogênese da DA e é baseada na perda significativa de neurônios colinérgicos e na redução nos níveis de acetilcolina (ACh) observadas no cérebro de indivíduos com a doença (Fontana; Kumar; Nordberg, 2023; Nasb; Tao; CHen, 2023). A ACh é um neurotransmissor presente nos sistemas nervoso central e periférico e está envolvido em funções cognitivas como aprendizado, memória e comportamento (Haam; Yakel, 2017; Nasb; Tao; CHen, 2023).

A síntese da ACh ocorre através da atividade da Colina Acetiltransferase (ChAT, E.C. 2.3.1.6) a partir da colina e de acetil-CoA nos neurônios colinérgicos (Figura 1) (Danışman *et al.*, 2022; Ferreira-Vieira *et al.*, 2016).

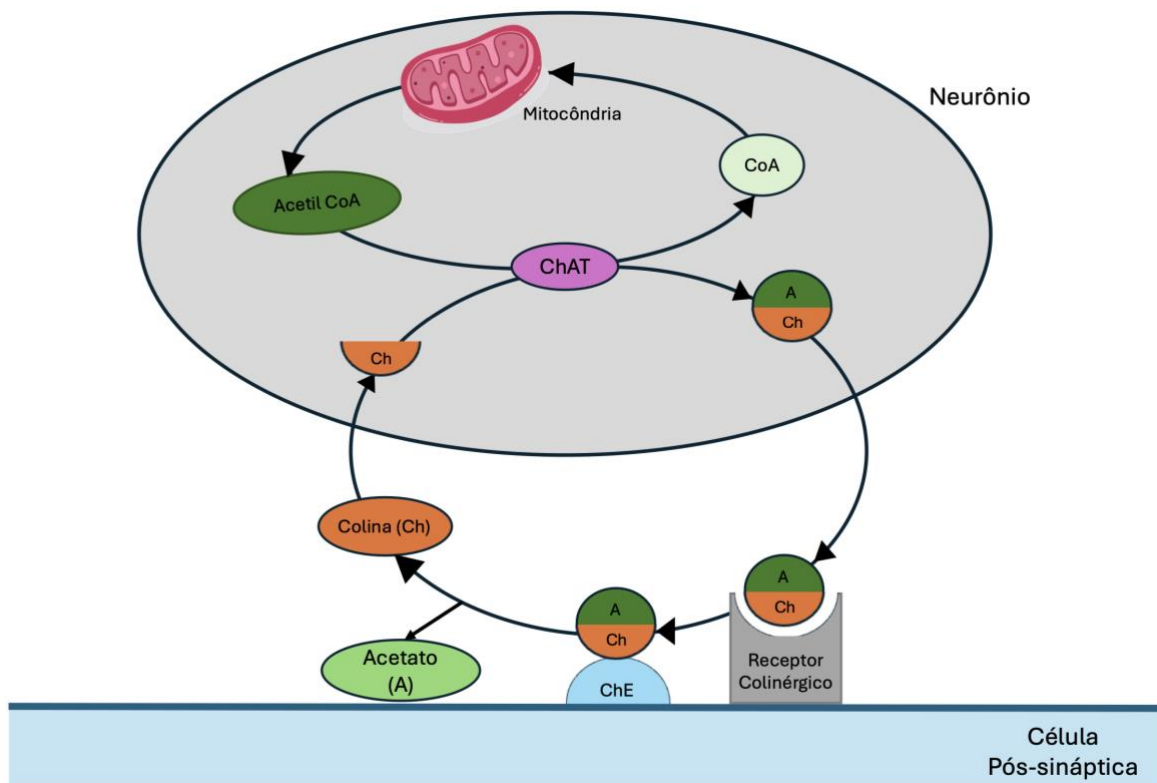


Figura 1. Representação esquemática da síntese de acetilcolina

A ACh é liberada na fenda sináptica, interage com seu receptor e é novamente liberado na fenda sináptica depois de se desligar do receptor. Esse excesso é removido pela atividade catalítica das colinesterases (ChEs) – acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, E.C. 3.1.1.8) – as quais produzem colina e acetato a partir da hidrólise do neurotransmissor. Em condições fisiológicas, o processo de degradação ocorre em equilíbrio com a síntese, o que garante a manutenção dos níveis apropriados de ACh. Em pacientes com DA, por sua vez, tem sido observada a redução nos níveis de neurônios colinérgicos e deficiência na atividade de ACh (Nasb; Tao; CHen, 2023), o que altera a transmissão sináptica e promove danos cognitivos.

3.1.1.1 Colinesterases

As colinesterases são amplamente distribuídas nos organismos vivos e são envolvidas em importantes mecanismos no sistema nervoso central e periférico. Essas enzimas são classificadas como proteínas homólogas da classe de proteínas alfa-beta, pertencem à família das esterases, e atuam preferencialmente na hidrólise de ésteres de colina (Andreeva *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2011). Apesar das similaridades, AChE e BuChE diferenciam no que diz respeito à especificidade ao substrato e na distribuição no organismo.

AChE é considerada uma das enzimas conhecidas mais eficientes (Taylor; Camp; Radic, 2009) e está presente nas junções neuromusculares e nas fibras colinérgicas e não colinérgicas, e atuam no controle do impulso nervoso, na contração muscular e ainda está envolvida nos processos de memória e cognição (Colovic *et al.*, 2013). No cérebro humano, AChE pode ser encontrada como monômeros, dímeros ou tetrâmeros, porém a forma mais comum são os dímeros (Rakonczay, 2003).

BuChE, por sua vez, é encontrada no plasma, mas sua maior concentração é observada no fígado, e o seu papel fisiológico não é completamente elucidado. A enzima está associada à hidrólise de compostos carboxílicos e fosfóricos, e está envolvida na hidrólise da ACh, especialmente em casos em que a via preferencial está inibida, com o objetivo de preservar o ciclo colinérgico em equilíbrio (Abubakar; Umar, 2021; Geula; Darvesh, 2004).

Apesar de as colinesterases apresentarem similaridades estruturais e identidade sequencial, apenas 10% da atividade colinérgica cerebral está relacionada à BuChE (Mushtaq *et al.*, 2014). Por outro lado, BuChE é capaz de hidrolisar uma variedade de substâncias, enquanto AChE é específica

para a ACh. Essas diferenças estão relacionadas ao sítio ativo das enzimas: os resíduos aromáticos no sítio periférico e próximos aos resíduos catalíticos observados em AChE são substituídos por resíduos hidrofóbicos menos volumosos em BuChE (Figura 2), o que torna o sítio ativo de BuChE capaz de hidrolisar moléculas maiores (Nicolet *et al.*, 2003).

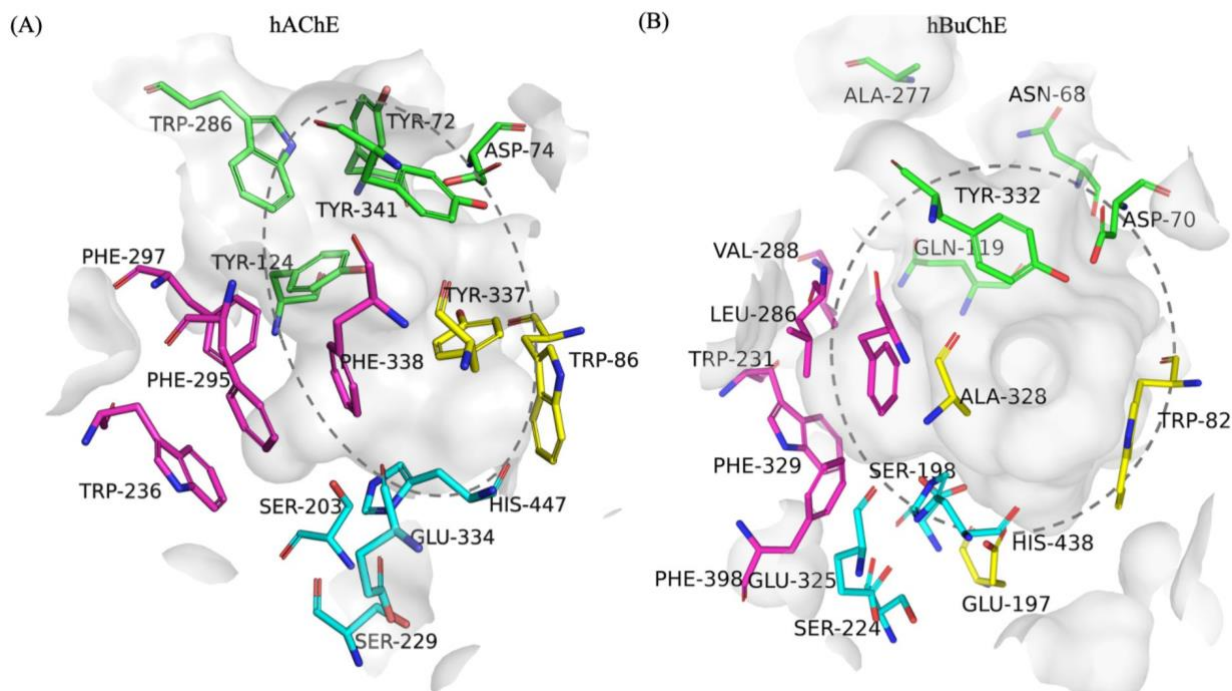


Figura 2. Sítio ativo de AChE (PDB ID: 4M0E) e BuChE (PDB ID: 4BDS). A superfície da fenda está representada em cinza semitransparente destacada pelo tracejado cinza. Os principais resíduos estão representados em bastões. Os resíduos catalíticos estão em ciano; os resíduos do sítio aniónico estão em magenta, e os resíduos de ligação da colina destacados em amarelo; os resíduos do sítio periférico estão em verde.

No entanto, as alterações observadas no cérebro de indivíduos com DA não estão limitadas à hipótese colinérgica. Diversos estudos têm mostrado que as colinesterases podem promover a formação de placas amiloides (Onder; Biberoglu; Tacal, 2019), as quais são a base para a hipótese amiloide.

3.1.2 Hipótese amiloide

A hipótese amiloide foi descrita pela primeira vez em 1992, quando também foi descrito o papel da Proteína Precursora Amiloide (PPA) na formação dos peptídeos β -amiloide (β A) e alguns aspectos genéticos envolvidos nesse processo (Hardy; Higgins, 1992). Esta hipótese é baseada no

depósito extracelular dos peptídeos β A, o qual é considerado uma definição importante da patologia da doença (Frisoni *et al.*, 2022; Karran; De Strooper, 2022) e sugere que a formação e deposição das placas é o evento que inicia o processo neurodegenerativo e os danos cognitivos (Arshavsky, 2020; Frisoni *et al.*, 2022).

A PPA é uma proteína transmembrana e pode ser processada em duas vias: amiloidogênica e não amiloidogênica (Nhan; Chiang; Koo, 2015). O caminho não amiloidogênico é o mais comum e ocorre na membrana plasmática, onde a PPA é clivada pela α -secretase e forma um fragmento solúvel (N-terminal) e um fragmento C-terminal, o qual é clivado posteriormente pela γ -secretase (Kuruva; Reddy, 2017; Nhan; Chiang; Koo, 2015; Zhao *et al.*, 2020). Os peptídeos resultantes da clivagem por γ -secretase não se acumulam e desempenham funções neuroprotetoras.

Por outro lado, pelo caminho amiloidogênico, a PPA é clivada pela beta-secretase (BACE-1) e produz um fragmento solúvel (N-terminal) e o fragmento C-terminal (C99), o qual é clivado pela γ -secretase e forma β A (Hempel *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2020). Os resíduos β A podem se apresentar como cadeias entre 38 a 43 aminoácidos, e as formas mais comuns no cérebro humano são as de 40 e de 42 aminoácidos; enquanto a β A40 é benigna, β A42 é altamente propensa a agregar-se em oligômeros que formam as placas. Com o envelhecimento, é comum a ocorrência de mutações e alterações metabólicas que promovem a formação de β A42 e sua agregação, bem como aumento da concentração e atividade de BACE-1 no cérebro (Cervellati *et al.*, 2020; Hempel *et al.*, 2010; Sehar *et al.*, 2022).

3.1.2.1 Beta-secretase 1

Beta-secretase 1 (BACE-1, E.C. 3.4.23.46) consiste em uma aspartil protease transmembrana da família das pepsinas formada por 501 aminoácidos; o sítio ativo é formado pela díade aspartil (Asp32 e Asp228), e está localizado no domínio extracelular, o que permite a orientação apropriada para a clivagem da PPA (Cole; Vassar, 2007; Hempel *et al.*, 2021; Paz *et al.*, 2018). A BACE-1 possui uma estrutura composta majoritariamente por folhas β , e por esse motivo apenas poucas alterações conformacionais são observadas durante a catálise (Xiong *et al.*, 2004). O mecanismo catalítico da BACE-1 envolve Asp32, Asp228 e uma molécula de água (Figura 3), e é otimizada em pH 4.5 (Paz *et al.*, 2018).

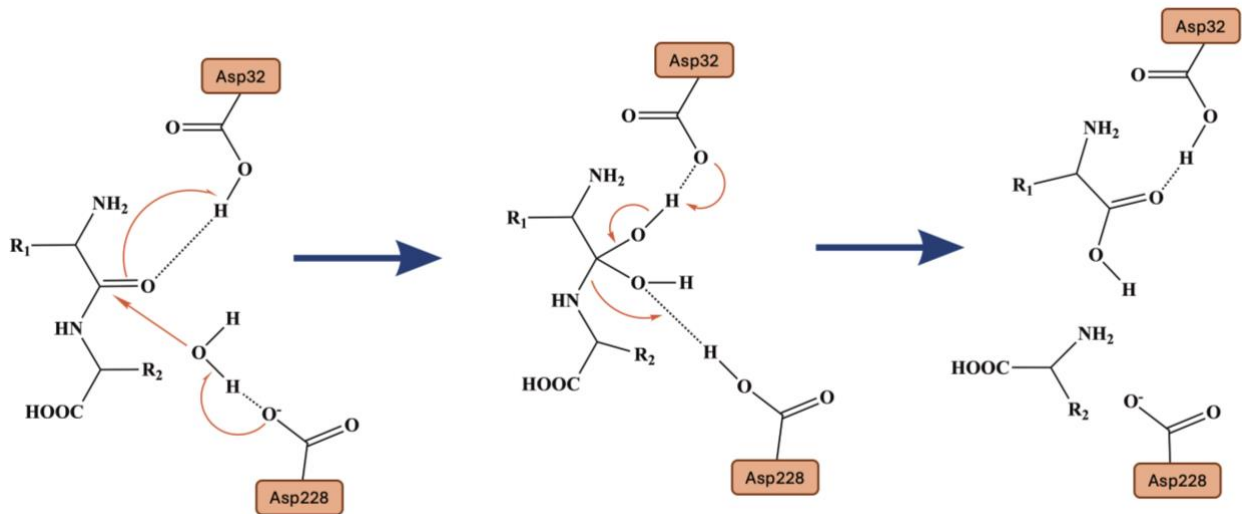


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo catalítico da BACE-1. Adaptado de (Paul *et al.*, 2016).

A BACE-1 é altamente expressa no cérebro, com abundância em diversos tipos de células neuronais e está envolvida no processamento da PPA e formação de β A. Em condições fisiológicas, β A está envolvida na gliogênese, neuroproteção e incremento de viabilidade celular, plasticidade sináptica e sobrevivência neuronal, mecanismos antioxidantes, resposta antimicrobiana, supressão tumoral e reparo de danos (Cai *et al.*, 2023; Volicer; Volicer; Volicer, 2020). Em pacientes com DA, os níveis de BACE-1 podem ser até 200% superior que em indivíduos saudáveis, o que explica a formação de placas amiloides e danos neuronais (Chaudhary *et al.*, 2018).

Adicionalmente à formação das placas amiloides, os β A estão também envolvidos no dano colinérgico (Chen *et al.*, 2022; Pedersen; Kloczewiak; Blusztajn, 1996). Diversos estudos mostram que, após injeções do peptídeo foram observados decréscimo de funções colinérgicas, aumento da atividade das colinesterases, redução na disponibilidade de acetilcolina bem como alta afinidade do β A42 aos receptores colinérgicos (Chen *et al.*, 2022; Rosenberry *et al.*, 2017). Esses dados revelam que ambas as hipóteses, colinérgica e amiloide, estão relacionadas e devem ser consideradas no que diz respeito ao tratamento de indivíduos portadores da DA.

3.2 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Os tratamentos disponíveis atualmente para indivíduos com DA incluem inibidores das colinesterases (Figura 4) (Conti Filho *et al.*, 2023), os quais são capazes de aumentar os níveis de

ACh na fenda sináptica e promover melhorias nos sintomas cognitivos. No entanto, essa abordagem possui benefícios limitados, uma vez que promove efeitos a curto prazo, mas não apresentam impactos na progressão da doença (Rusek *et al.*, 2023). Além disso, esses fármacos podem induzir efeitos adversos, como perda muscular, distúrbios do sono, desordens gastrointestinais, náusea e alterações cardiovasculares, os quais levam à redução da adesão à terapia. Desse modo, o desenvolvimento de uma terapia eficiente para a DA consiste em um desafio devido à sua complexidade e, por esse motivo, as descobertas acerca das desordens nos sistemas de neurotransmissão envolvidas na função cognitiva são amplamente investigadas como alvos terapêuticos (Jeremic; Jiménez-Díaz; Navarro-López, 2023).

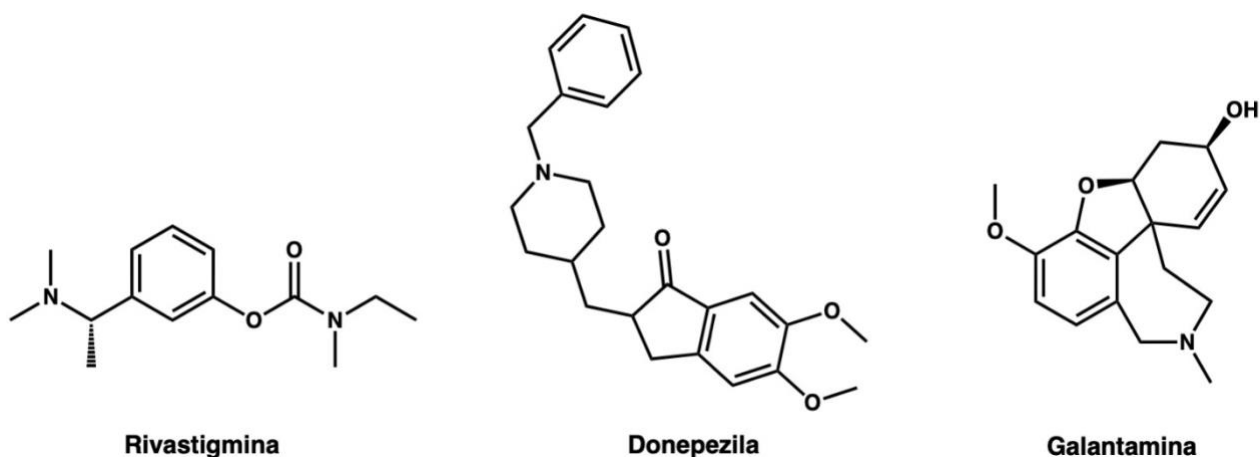


Figura 4. Tratamentos disponíveis para a DA.

As principais investigações no contexto do desenvolvimento de fármacos contra DA atualmente são baseadas na hipótese amiloide, e tem como alvo a BACE-1 (Jeremic; Jiménez-Díaz; Navarro-López, 2023). Além da busca por micromoléculas, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais com alvo em diferentes estágios da cascata amiloide (desde os monômeros às placas depositadas) consiste em uma abordagem amplamente utilizada (Dantas *et al.*, 2024), uma vez que apresenta benefícios associados à seletividade e maior meia vida.

Em 2021 os órgãos reguladores sanitários dos Estados Unidos da América aprovaram o primeiro biofármaco direcionado especificamente para a patofisiologia da DA, conhecido como Aducanumab, o qual é um anticorpo monoclonal que afeta os agregados β A e leva a redução de placas depositadas no cérebro (Rahman *et al.*, 2023). Após aprovação, este fármaco causou preocupações acerca da segurança devido ao surgimento de eventos adversos, como anormalidades

em exames de imagem do cérebro, bem como eventos menos graves como náusea, dores de cabeça e confusão. Apesar do aspecto inovador desse fármaco em ser o primeiro fármaco capaz de modificar o curso da doença, os desenvolvedores do Aducanumab anunciaram a retirada do fármaco do mercado em 2024 (Biogen, 2024).

Posteriormente, em abril de 2025, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o Donanemabe (Brasil, 2025), um anticorpo monoclonal com mecanismo de ação similar ao Aducanumab. O medicamento foi avaliado em um estudo principal envolvendo pacientes com DA em estágio inicial e o tratamento com o Donanemabe demonstrou resultados significativos no que diz respeito à redução nos níveis de placas amiloides bem como progressão clínica menor quando comparados aos pacientes tratados com placebo. Após aprovação para uso em larga escala, a ANVISA irá monitorar a segurança e efetividade do medicamento por ações de farmacovigilância.

Apesar dos benefícios, o uso de anticorpos monoclonais pode apresentar uma série de problemas de segurança relacionados à imunomodulação e risco aumentado de infecções, bem como demandam alto custo (Hansel *et al.*, 2010). Adicionalmente, na maior parte dos casos, a administração dos biofármacos é realizada em ambiente hospitalar e, tais limitações demonstram que, apesar das recentes descobertas, as buscas pela identificação de fármacos eficazes e seguros para tratar a DA segue ainda um desafio.

Nos últimos anos, diversos inibidores da BACE-1 avançaram para ensaios clínicos, porém sem sucesso (Rombouts *et al.*, 2021). A principal causa para o encerramento dos ensaios consiste em toxicidade e baixa eficácia, mesmo em casos em que o fármaco é administrado em estágios iniciais. Os aspectos de toxicidade, por sua vez, estão relacionados à ausência de seletividade da BACE-1 frente a BACE-2, uma vez que são proteínas homólogas com 55% de identidade sequencial (Fujimoto *et al.*, 2021). A BACE-2 está envolvida na atividade pancreática e secreção de insulina, e desempenha papel na neuroproteção, e a ausência de seletividade desencadeia efeitos adversos relacionados a funções neuroprotetoras e fisiológicas (Jeremic; Jiménez-Díaz; Navarro-López, 2023; Rombouts *et al.*, 2021).

Um dos primeiros inibidores da BACE-1 a receber atenção foi o Verubecestat, o qual apresentou elevado potencial em reduzir os níveis de β A em ratos, macacos e no fluido cerebrospinal em humanos. No entanto, os ensaios clínicos de fase 3 revelaram que este composto

é ineficaz para tratar pacientes em fases mais avançadas da DA, podendo até promover pioras na função cognitiva (Doggrell, 2019; Egan *et al.*, 2019).

A ausência de efeitos na cognição bem como as altas taxas de falhas nos ensaios para desenvolvimento de fármacos levam a questionamentos acerca das hipóteses envolvendo a etiologia da DA (Jeremic; Jiménez-Díaz; Navarro-López, 2023; Rahman *et al.*, 2023). Todavia, estudos mostram que a supressão da BACE-1 é capaz de eliminar placas amiloides, mas não são capazes de compensar a perda neuronal previamente instalada (Hu *et al.*, 2018). Adicionalmente, existem evidências de que algumas funções das colinesterases estão associadas a agregação β A (Lane; Potkin; Enz, 2006). Dessa forma, as taxas de falhas podem ser atribuídas ao fato de que esses estudos não consideram o aspecto multifatorial da DA, a qual envolve diversos caminhos metabólicos.

Para tratar doenças complexas como DA, a indústria farmacêutica tem investido em identificar potenciais estruturas que são capazes de atuar simultaneamente em mais de um alvo (compostos multialvo) (Kumar; Saha; Roy, 2023). Essa abordagem promove uma série de vantagens, como aumento de eficácia, melhor perfil farmacocinético, redução no risco de toxicidade e melhor adesão terapêutica. No entanto, o desenvolvimento de ligantes multialvos consiste em um desafio e, para atingir esse objetivo, os esforços devem ser dedicados ao uso de diversas abordagens, como a associação de estratégias *in silico* e *in vitro*.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

3.3.1 Estratégias *in silico* para identificação de moléculas bioativas

A identificação de moléculas bioativas e o desenvolvimento de novos fármacos é um processo dispendioso, no que diz respeito a tempo e custo, chegando a custar mais de 4 bilhões de dólares (Sertkaya *et al.*, 2024) e envolve identificação e validação de alvos terapêuticos, descoberta e otimização de compostos, bem como os ensaios pré-clínicos e clínicos (Shaker *et al.*, 2021). Trata-se de um processo influenciado pela complexidade dos alvos a serem modulados e da doença em si, que necessita de uma abordagem multidisciplinar e envolve uma série de técnicas de investigação, bem como parte de um amplo espaço químico para identificar novos fármacos em potencial (Rizzuti; Grande, 2020). No que diz respeito à identificação de fármacos multialvos, pode

ser acrescentado como maior desafio do processo o alcance de um balanço de atividade frente aos alvos desejados mantendo o perfil de seletividade e segurança necessários (Li *et al.*, 2021).

A estratégia mais comumente empregada para identificação de fármacos multialvos consiste na técnica conhecida como hibridação molecular, que corresponde à união de duas ou mais unidades farmacofóricas de compostos biologicamente ativos formando uma nova entidade química com múltiplos modos de ação (Morphy; Kay; Rankovic, 2004; Zhou *et al.*, 2019). No entanto, a síntese de híbridos envolve um espaço químico de busca limitado, e encontra desafios no que diz respeito a obtenção de compostos com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas apropriadas essenciais para a resposta biológica (Herrmann; KUMAR; Tsogoeva, 2020).

Com o objetivo de otimizar o desenvolvimento de novos fármacos multialvos, uma estratégia que vem sendo largamente utilizada é o reposicionamento de fármacos, que consiste na identificação de novas aplicações para fármacos previamente aprovados pelos órgãos regulatórios, ou seja, investigação de fármacos existentes para novas indicações terapêuticas (Sahoo *et al.*, 2021). Classicamente, essa estratégia tem registros de descobertas ao acaso, através da identificação de eventos adversos indesejados sendo utilizados como ponto de partida para explorar a possibilidade de eficácia em uma condição médica diversa ao propósito original (Dotolo *et al.*, 2021; Sahoo *et al.*, 2021). No entanto, com o avanço da tecnologia e desenvolvimento dos algoritmos de inteligência artificial e de diversas ferramentas da bioinformática, a investigação de possíveis interações entre fármacos e alvos proteicos tem sido realizada de forma mais sistemática. Desse modo, o reposicionamento de fármacos por estratégias *in silico* consiste em uma abordagem com vantagens significativas, como por exemplo velocidade e custos reduzidos.

As principais estratégias *in silico* para reposicionamento de fármacos correspondem a estratégias baseadas na estrutura, seja triagem virtual baseada em ligantes, como através de modelo farmacofórico, ou em triagem virtual baseada no alvo molecular, como triagem virtual por acoplamento molecular (Kulkarni *et al.*, 2023).

Um modelo farmacofórico é um modelo molecular que ilustra as características responsáveis para a atividade biológica de um fármaco, e corresponde a uma estratégia computacional amplamente empregada para identificação de compostos potencialmente ativos a partir de bibliotecas virtuais (Choudhury; Sastry, 2019; Polishchuk *et al.*, 2019). Apesar de ser uma ferramenta valiosa para a priorização de compostos e reposicionamento de fármacos, o filtro por

modelo farmacofórico é baseado no desvio entre o modelo e as moléculas alinhadas e desconsidera a compatibilidade com o receptor, e as informações estéreo-eletrônicas extraídas dos ligantes não conseguem avaliar as interações estabelecidas frente ao sítio de ligação (Qing *et al.*, 2014). Por esse motivo, rotinas de triagem virtual baseada em ligantes podem ser associadas a estratégias baseadas no alvo molecular como uma forma de priorizar compostos potencialmente ativos.

O acoplamento molecular, por sua vez, é uma estratégia computacional baseada na estrutura da proteína estudada e é amplamente utilizada em estudos onde a estrutura tridimensional da proteína está elucidada e disponível (Stanzione; Giangreco; Cole, 2021). O método é capaz de identificar novas estruturas que são capazes de se ligar em proteínas, e ainda fornece informações úteis para a elucidação do mecanismo estrutural pela qual um ligante consegue influenciar na atividade do alvo biológico (Paggi; Pandit; Dror, 2024; Stanzione; Giangreco; Cole, 2021). As análises envolvem duas etapas básicas, as quais são predição da conformação e do posicionamento do ligante no sítio ativo e a avaliação da qualidade dessa conformação através de um valor numérico (pontuação), sugerindo o quão estável o complexo formado entre ligante e macromolécula será (Figura 5) (Paggi; Pandit; Dror, 2024; Raval; Ganatra, 2022; Stanzione; Giangreco; Cole, 2021).

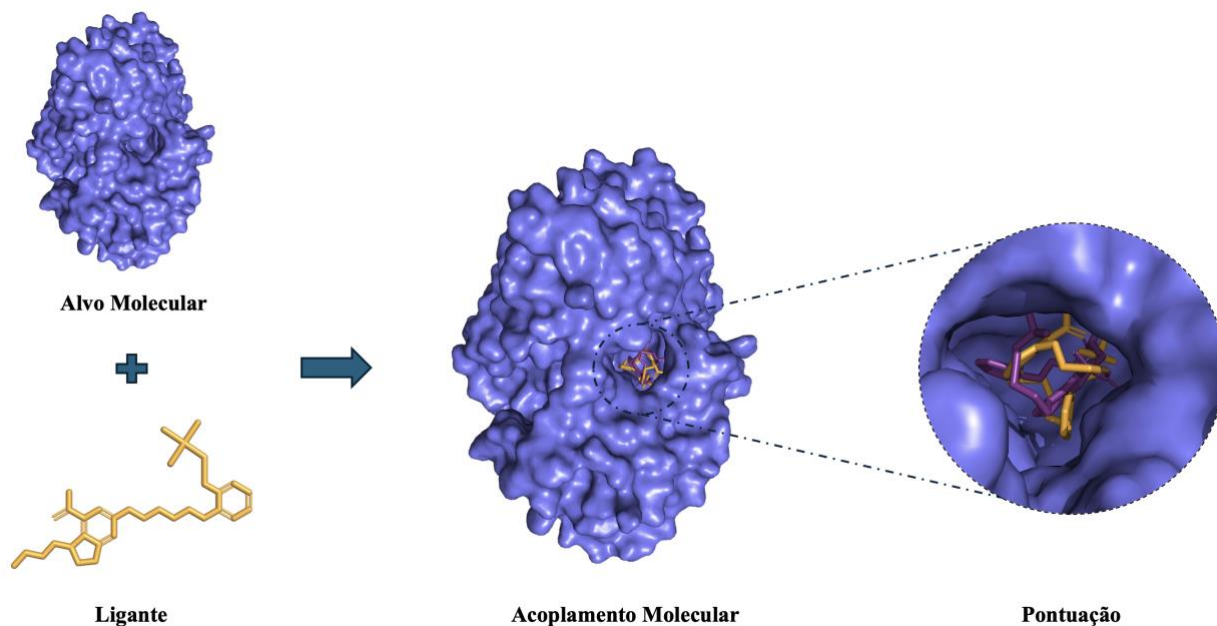


Figura 5. Representação esquemática do acoplamento molecular

Atualmente, com o crescimento do número de estruturas proteicas de alta resolução em bancos de dados, o uso de acoplamento molecular tem sido cada vez mais difundido (Paggi; Pandit; Dror, 2024; Sethi *et al.*, 2020). Somado a isso, diversos programas têm sido desenvolvidos e aprimorados, com o intuito de tornar as predições cada vez mais acuradas. Entretanto, após a priorização dos candidatos promissores por triagem virtual, torna-se essencial a realização de ensaios biológicos que permitam validar experimentalmente o potencial desses compostos. Embora as abordagens *in silico* forneçam informações importantes sobre a afinidade e modo de interação com os alvos moleculares, é por meio dos testes *in vitro* que se verifica, de fato, a atividade biológica e a seletividade dos ligantes em sistemas celulares ou enzimáticos.

3.3.2 Estratégias *in vitro* para avaliação de atividade biológica

Ao longo dos anos, várias metodologias foram desenvolvidas para avaliação de atividade biológica. Geralmente a primeira etapa nessa avaliação é a realização de ensaios *in vitro*, já que representam um custo relativamente baixo no processo de descoberta de fármacos, e podem identificar importantes informações preliminares sobre relevância clínica e tolerabilidade (Calligaro, 2018).

No que diz respeito a avaliação de tolerabilidade, um desafio importante consiste na caracterização do risco de desenvolvimento de neurotoxicidade em potenciais fármacos com efeito a nível cerebral (Radio *et al.*, 2008). Um dos modelos mais comuns utilizados para a avaliação de neurotoxicidade consiste na utilização de células PC12, linhagem celular oriunda do feocromocitoma de ratos com alto poder de diferenciação, capazes de se diferenciar em células que se aproximam dos neurônios em termos de morfologia, fisiologia e funções bioquímicas (Chua; Lim, 2021; Xie *et al.*, 2023), avaliadas após exposição a materiais por metodologias como o ensaio utilizando brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). O teste MTT é um teste colorimétrico de proliferação e sobrevivência celular, baseado na conversão de MTT em cristais de formazan de cor púrpura por células vivas, o que revela atividade mitocondrial (Kamiloglu *et al.*, 2020). As células mortas perdem sua habilidade de reduzir o MTT e formar os cristais de formazan, os quais podem ser mensurados por absorvância a 570 nm e, dessa forma, a intensidade da cor formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na cultura.

As células PC12 podem ainda ser utilizadas para avaliação da atividade inibitória frente a BACE-1, uma vez que essa linhagem celular é capaz de expressar a enzima, responsável pela secreção de neurotransmissores e regulação da exocitose (Lee *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Esses ensaios para identificação de atividade inibitória frente à BACE-1 são realizados principalmente através do monitoramento de transferência energética por fluorescência dos substratos peptídicos acoplados a pares de doador-aceptor, os quais sofrem separação por hidrólise (Mancini *et al.*, 2007; Porcari *et al.*, 2005). Esse método baseia-se no fato de que, quando o substrato se encontra no seu estado não clivado, a fluorescência do doador é anulada pela do aceitador; por outro lado, quando a cadeia peptídica é clivada pela BACE-1, a fluorescência do doador cresce linearmente à taxa de proteólise (Mancini; De Simone; Andrisano, 2011). Quando a enzima é inibida, o aumento da fluorescência não acontece.

Os ensaios para identificação de atividade frente às colinesterases, por sua vez, baseiam-se no princípio da colorimetria na região de luz visível. O método mais comumente empregado é o método descrito por Ellman e colaboradores em 1961, e é fundamentado na produção de tiocolina resultante da hidrólise de acetiltiocolina, a qual interage com o ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (DTNB) formando um produto de cor amarela que pode ser medido por absorbância a 412 nm (Ellman *et al.*, 1961; Liu; Xu; Dong, 2021). Desse modo, na presença de uma substância a ser analisada, a atividade da AChE e BuChE pode ser avaliada através da coloração desenvolvida no sistema em comparação à resposta obtida com uma amostra controle (Tsagkaris *et al.*, 2020). Nesses testes, a atividade inibitória é inversamente proporcional à formação de cor.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* permitem confirmar ou refutar os dados fornecidos pelas estratégias de triagem virtual. No entanto, para uma compreensão mais aprofundada das interações intermoleculares envolvidas na formação do complexo ligante-receptor e responsáveis pelos efeitos observados nos testes de avaliação biológica, a aplicação de simulações de dinâmica molecular se mostra uma estratégia fundamental.

3.3.3 Planejamento de novos derivados

As simulações de dinâmica molecular (DM) conseguem avaliar o comportamento dos sistemas em condições que simulam o ambiente biológico, uma vez que consideram a flexibilidade total entre o complexo ligante-macromolécula (Gowers *et al.*, 2016; Hansson; Oostenbrink; Van

Gunsteren, 2002). Nas simulações de DM, os átomos são tratados como partículas que se movem em função das leis da mecânica clássica e essas simulações são ferramentas importantes nos estudos de desenvolvimento de moléculas bioativas pois permite compreender detalhadamente os movimentos das partículas em função do tempo (Karplus; McCammon, 2002; Maginn; Elliott, 2010). Apesar do custo computacional alto, as simulações de DM têm sido largamente utilizadas no âmbito da descoberta e otimização de compostos bioativos. Além disso, essas simulações permitem hipotetizar mecanismos de ação de fármacos e perfil de seletividade, e fornecem informações que, juntamente com outras estratégias computacionais como o acoplamento molecular, são fundamentais para otimização de ligantes, com o intuito de desenvolver compostos com maior eficácia e segurança (Paggi; Pandit; Dror, 2024; Zhao; Caflisch, 2015). Dessa forma, a integração entre as previsões computacionais e a avaliação experimental representa um passo crítico para confirmar a eficácia dos compostos e orientar as etapas subsequentes de otimização estrutural.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR

Células PC12 foram cultivadas em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com alto teor de glicose (Gibco™) suplementado por 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, solução antibiótica 1 % contendo estreptomicina (100 mg/mL) e penicilina (100 U/mL), e Soro Fetal Bovino (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*), e mantido em um incubador com atmosfera umidificada com 5 % CO₂ a 37 °C até alcançar 80% de confluência. As células foram destacadas usando uma solução de tripsina 0,25 % com EDTA 0,2 %, e colocadas em placas de 96 poços com densidade de 7x10⁴ células/poço. Após 24 horas de incubação, as células PC12 foram incubadas com amostras em diferentes concentrações (1, 10, 25, 50, 75 ou 100 µg/mL) por 24 horas, sem FBS, a 37 °C em atmosfera umidificada com 5 % CO₂. No dia seguinte, o meio foi removido e substituído por um meio contendo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) em concentração de 0,5 mg/mL e incubado por 2 horas a 37 °C. Após esse período, foi adicionado 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) ao poço e homogeneizado por 15 minutos protegido de luz. A densidade ótica (OD, do inglês *Optical Density*) foi lida a 590 nm em leitor de microplacas Varioskan™ LUX. A taxa de viabilidade celular foi calculada conforme a equação: Taxa de viabilidade celular (%) = (OD_{grupo teste} - OD_{branco do grupo teste}) / (OD_{grupo controle} - OD_{branco do grupo controle}) × 100% (Huang *et al.*, 2020; Zeng; Xu; Zheng, 2017).

4.2 ENSAIOS CELULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-BACE-1

A avaliação da atividade inibitória da BACE-1 foi realizada com células PC12 através do kit de ensaio de atividade fluorimétrica da BACE (MAK237) adquirido da Sigma-Aldrich® de acordo com instruções do fabricante. As células foram distribuídas em uma placa de seis poços 5,2x10⁵ células/cm² e incubadas por 24 horas em atmosfera umidificada com 5 % CO₂. Posteriormente, as células foram tratadas com DMSO (controle) ou 3 µM de amostra, nas mesmas condições, por mais 24 horas. No dia seguinte, as células foram destacadas da placa de seis poços usando solução de tripsina 0,25 % com EDTA 0,2 %, e centrifugada por cinco minutos a 700 x g. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 0,1 mL de tampão de extração gelado na mistura

de células. O lisado celular foi incubado em gelo por 10 minutos e centrifugado a 10000 x g por cinco minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e mantido sob refrigeração em banho de gelo. Em uma placa de 96 poços, em cada poço foi adicionado 50 µL de lisado celular. O lisado celular do poço tratado com DMSO foi tratado como controle negativo. O controle positivo consistiu no mesmo lisado celular tratado com DMSO adicionado de 2 µL do inibidor padrão de BACE-1 fornecido no kit. 50 µL do tampão de reação foi adicionado e as amostras foram gentilmente agitadas e incubadas por 20 minutos a 37 °C. Após esse período, 2 µL de substrato foi adicionado e a placa foi incubada por 10 minutos a 37 °C. Após, a placa foi coberta e gentilmente misturada e incubada livre de luz a 37 °C por 1 hora e então as amostras foram lidas em fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$). A concentração total de proteína foi calculada usando o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). A atividade da BACE-1 foi medida por fluorescência/µg de proteína na amostra.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

A avaliação da atividade anticolinesterásica foi realizada conforme descrito previamente por Ellman e colaboradores (Ellman *et al.*, 1961), adaptado para microplacas de 96 poços, usando os parâmetros cinéticos previamente determinada pelo grupo (de Almeida, R. B. M. *et al.*, 2023).

As enzimas utilizadas foram acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* tipo IV e butirilcolinesterase obtida de soro equino. Foram utilizados também o reagente de Ellman (ácido 5.5'-ditiobis-2-nitrobenzoico – DTNB), albumina de soro bovino e acetiltiocolina, os quais foram obtidos na Sigma-Aldrich®.

Para os ensaios de AChE, em cada poço foram adicionados 140 µL de 0,1 M tampão fosfato (pH 7,4) contendo 0,1% de albumina, 20 µL da amostra diluída em etanol, 20 µL da solução enzimática a 0,15 U/mL, 10 µL de 0,01 M DTNB e 10 µL de acetiltiocolina a 0,125 mM, conforme descrito por de Almeida e colaboradores (de Almeida, R. B. M. *et al.*, 2023). Para os ensaios com a BuChE, foram utilizados 20 µL da solução enzimática a 0,10 U/mL e 10 µL de acetiltiocolina a 0,744 mM em adição aos demais reagentes.

As amostras foram testadas em concentrações variáveis para cálculo do IC50. Etanol (controle negativo) foi utilizado como diluente da amostra. Eserina (10 µM) foi usado como

inibidor (controle positivo) em ambos os testes. Os testes foram realizados em triplicata e a absorbância medida a 405 nm em ciclos de 10 minutos para AChE e 20 minutos para BuChE.

4.4 PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DA SILODOSINA

4.4.1 Planejamento de derivados da silodosina

4.4.1.1 Simulações de Dinâmica Molecular

As formas APO e complexo com os ligantes foram avaliadas em simulações de Dinâmica Molecular (DM). As coordenadas 3D dos ligantes foram submetidas ao servidor ATB 3.0 (<https://atb.uq.edu.au/index.py>) (Stroet *et al.*, 2018) para obtenção das informações de topologia. Os parâmetros de carga atômica, comprimento de ligação, ângulos torcionais e diedrais foram obtidas através do campo de força GROMOS 54A7 (Schmid *et al.*, 2011). As simulações de DM foram realizadas no pacote GROMACS 5.1.2 (Abraham *et al.*, 2015), e adotados os parâmetros do campo de força GROMOS 54A7, $t = 25\text{ °C}$ e $p = 1\text{ atm}$.

As estruturas 3D de AChE, BuChE e BACE-1 foram obtidas do servidor *Protein DataBank* (PDB) (ID AChE: 4M0E; ID BuChE: 4BDS; ID BACE-1: 6UWP) (Cheung *et al.*, 2013; Nachon *et al.*, 2013; Winneroski *et al.*, 2020), e preparadas com o auxílio do módulo *Biopolymer* implementado no SYBYL-X 2.0, para remoção do ligante cristalográfico, moléculas de água e artefatos estruturais. Regiões não modeladas foram construídas com o auxílio do servidor SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018).

O estado de protonação foi ajustado pelo módulo *pdb2gmx* implementado no GROMACS 5.1.2 de acordo com o pH 7,4 para as colinesterases (Mascarenhas *et al.*, 2020) e pH 4,5 para BACE-1 (Domínguez *et al.*, 2010). Os valores de pKa dos resíduos foram avaliados no servidor H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/index.php>), com exceção para os resíduos catalíticos da BACE-1, os quais foram ajustados manualmente para o estado protonado (Asp32) e desprotonado (Asp228) (Mermelstein; McCammon; Walker, 2019). Para solvatação dos sistemas foram usadas caixas dodecaédricas com modelo de água SPC-e (Berendsen; Grigera; Straatsma, 1987) com uma distância mínima de 1.4 nm das extremidades da caixa. Contraíons (Na^+ e Cl^-) foram utilizados para neutralizar os sistemas com auxílio do módulo *genion*.

As formas APO e complexo foram minimizados em dois passos: inicialmente o *Steepest Descent* (SD) algoritmo com 10000 ciclos e, posteriormente, pelo algoritmo *Conjugated Gradient* (CG) com 1000 ciclos. Após os passos de minimização, a etapa de equilíbrio foi realizada ($t = 1$ ns) e, por fim, a dinâmica de produção sob 300 K e 1 atm. Os módulos GROMACS rms, rmsf e hbond foram utilizados para analisar estabilidade e comportamento de cada sistema. A energia livre de ligação dos complexos foi calculada pelo método de Mecânica Molecular *Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM/PBSA, g_mmpbsa).

4.4.1.2 Planejamento de derivados de silodosina

Com base nos dados obtidos previamente por ensaios de acoplamento molecular (Barbosa *et al.*, 2023), simulações de DM e os ensaios *in vitro*, um conjunto de 30 derivados da silodosina foi proposto (Tabela 1) para síntese e avaliação biológica. Os requisitos estruturais para a afinidade da Silodosina nos sítios ativos de AChE, BuChE e BACE-1 foram utilizados para a proposta dos derivados (Figura 6).

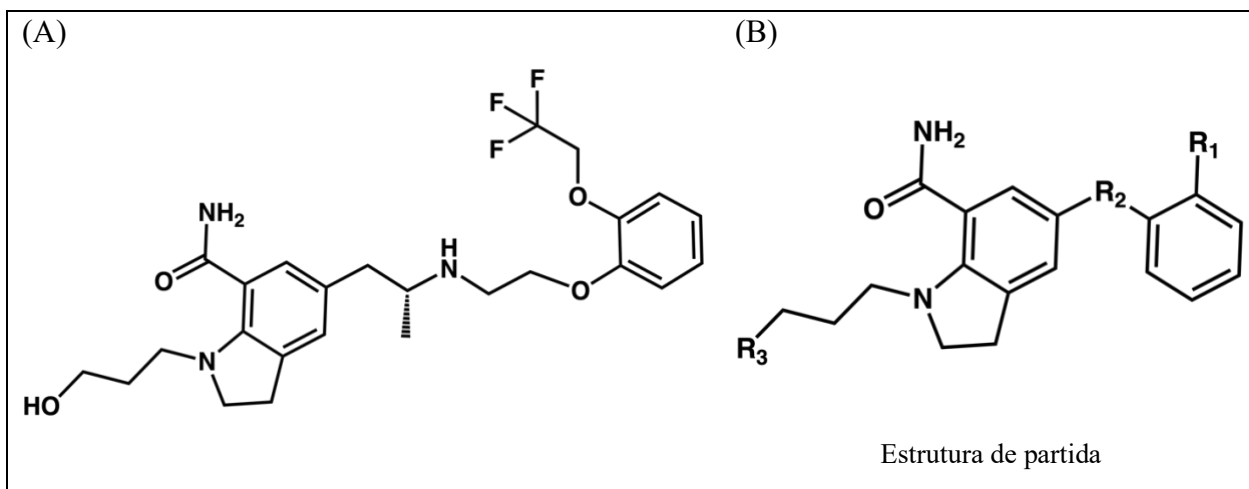
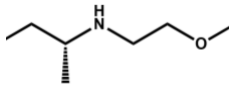
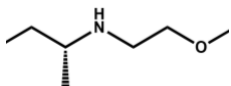
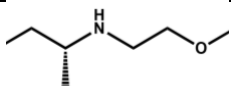
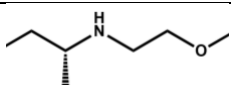
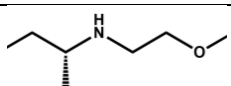
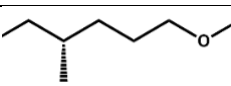
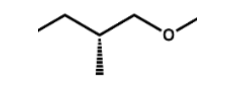
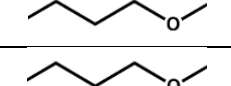
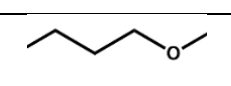
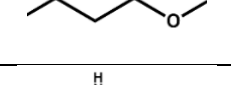
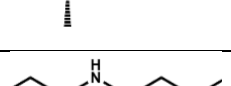
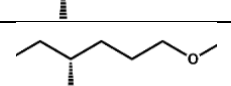
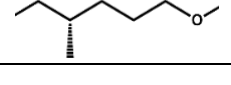
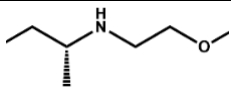
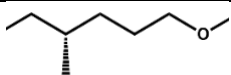
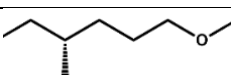
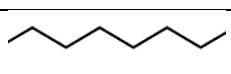
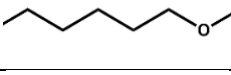
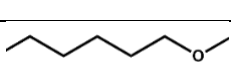
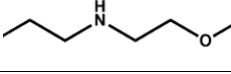
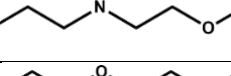
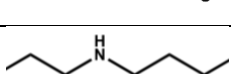
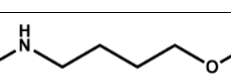
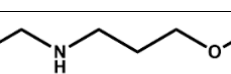
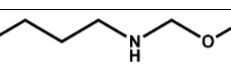


Figura 6. A) Silodosina (Pontuação_{AChE} = -8,0 kcal/mol; Pontuação_{BuChE} = -8,1 kcal/mol; Pontuação_{BACE-1} = 43,55) (Barbosa *et al.*, 2023) e (B) estrutura de partida para os derivados da Silodosina.

A estrutura de partida (Figura 6B) foi utilizada como modelo para a proposição dos derivados. Foram realizadas trocas bioisostéricas, bem como simplificação estrutural nas posições R₁, R₂ e R₃, conforme representado na Tabela 1.

Tabela 1. Estrutura química de novos derivados de silodosina.

	R₁	R₂	R₃
S01	OCH ₃		OH
S02	OCH ₂ CH ₃		OH
S03	O-CH(CH ₃) ₂		OH
S04	O-cProp		OH
S05	CH ₃		OH
S06	OCH ₂ CF ₃		OH
S07	OCH ₂ CF ₃		OH
S08	OCH ₂ CF ₃		OH
S09	OCH ₂ CH ₃		OH
S10	OCH ₂ CH ₂ CH ₃		OH
S11	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂		OH
S12	OCH ₂ CCl ₃		OH
S13	OCH ₂ Cl		OH
S14	OCH ₂ CF ₃		NH ₂
S15	OCH ₂ CF ₃		Cl

S16	OCH ₂ CF ₃		Cl
S17	OCHC(CH ₃) ₃		OH
S18	CH ₃		OH
S19	CH ₃		OH
S20	CH ₂ CH ₂ C(CH ₃) ₃		OH
S21	OCH ₂ CF ₃		OH
S22	OCH ₃		OH
S23	OH		OH
S24	OH		OH
S25	OCH ₃		OH
S26	OH		OH
S27	OH		OH
S28	OH		OH
S29	OH		OH
S30	OH		OH

4.4.1.3 Priorização do derivado de silodosina

As estruturas planejadas foram construídas com o auxílio do programa ChemDraw 22.2.0 (PerkinElmer Informatics, 2023) e submetidas a ensaios de acoplamento molecular frente aos três alvos, seguindo parâmetros previamente validados (do Bomfim *et al.*, 2022; Mascarenhas *et al.*, 2020). As estruturas cristalográficas utilizadas foram as mesmas utilizadas nas simulações de DM e preparadas conforme descrito previamente (Seção 4.5.1.1), somado à adição de átomos de hidrogênio. O estado de protonação das colinesterases foi ajustado ao pH 7,4 com o auxílio do

servidor PropKa e a busca conformacional e pontuação foram realizadas pelo programa AutoDock Vina 1.1.2 (Trott; Olson, 2009)(Mascarenhas *et al.*, 2020). Para o acoplamento com a BACE-1, o estado de protonação do receptor foi avaliado pelo programa H++ 1.0 e pKa corrigido ao pH 4,5 (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2010). O programa utilizado para acoplamento molecular com a BACE-1 foi o GOLD 5.8.1 (JONES *et al.*, 1997), no qual o espaço de busca foi delimitado pelo ligante cristalográfico, restrito a uma esfera de 10 Å e a pontuação foi fornecida pela função ASP (do Bomfim *et al.*, 2022).

A molécula com menor valor de energia de afinidade frente à AChE foi selecionada para síntese e caracterização.

4.4.2 Síntese do derivado de silodosina priorizado¹

A rota de síntese do derivado priorizado por ensaios de acoplamento molecular (derivado S23) foi sugerida conforme Figura 7, e as reações estão detalhadas a seguir. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) obtidos para os intermediários e o composto final estão apresentados no Apêndice A.

¹ O processo de síntese do derivado foi desenvolvido durante período de doutorado sanduíche, em colaboração com a University of Incarnate Word, Texas.

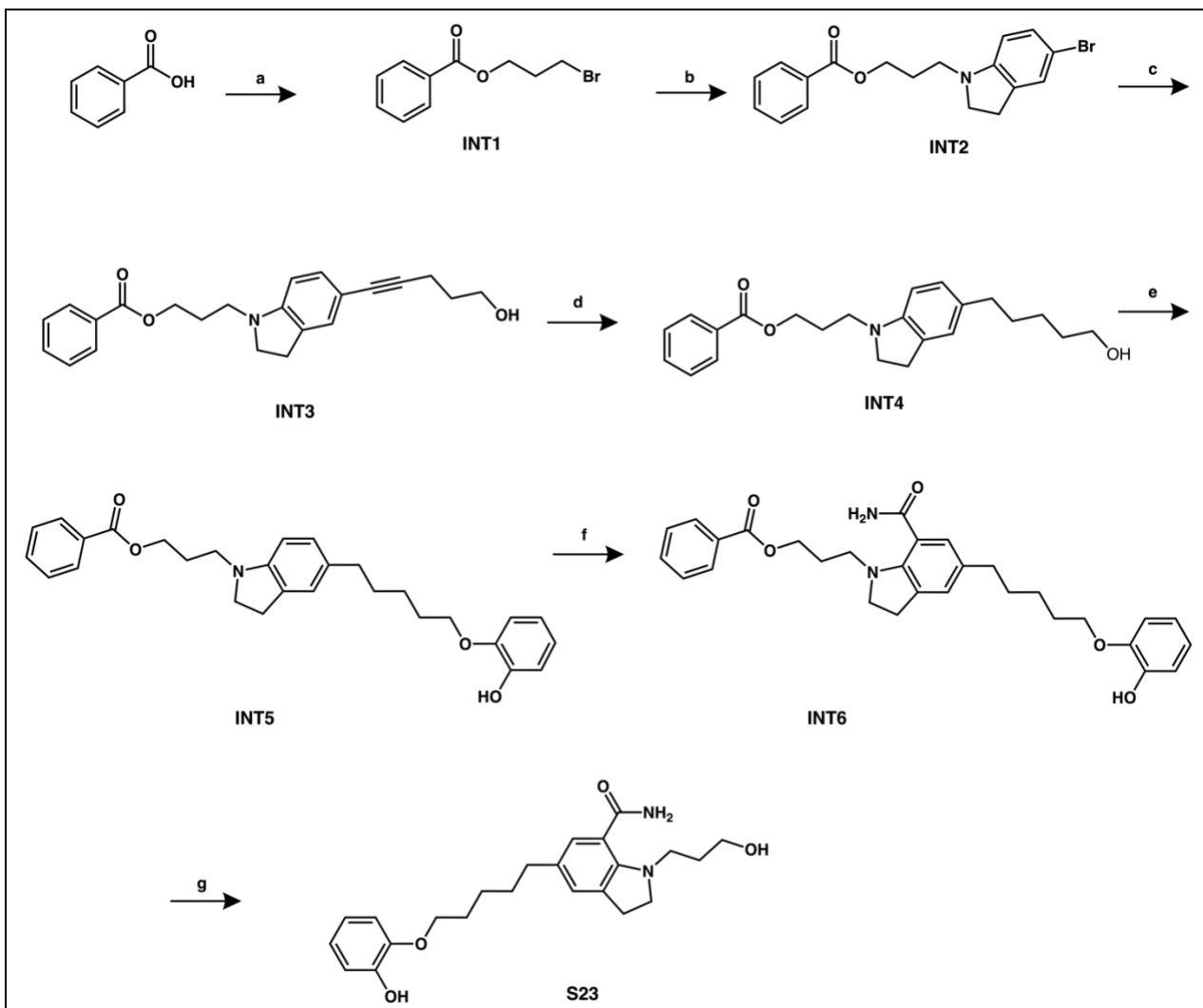
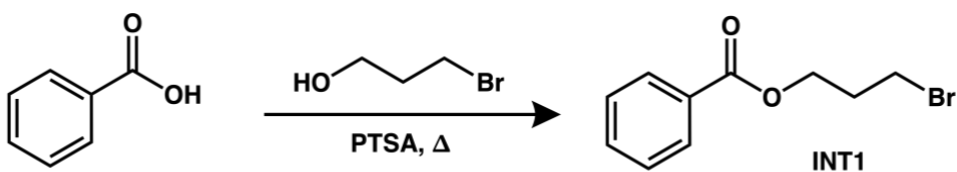
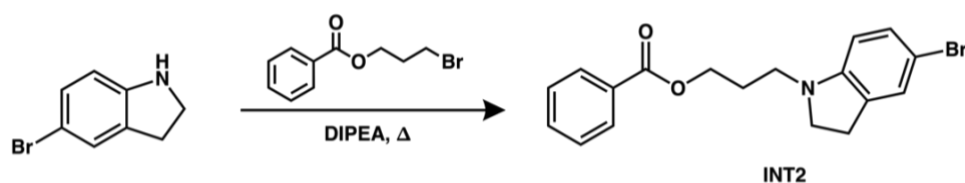


Figura 7. Esquema proposto para síntese de S23. a) 3-bromopropanol, ácido *p*-toluenosulfônico, aquecimento; b) 5-bromoindol, diisopropiletilamina, aquecimento; c) 1-bromohex-5-ino, dicloro-di(trifenil)paládio, fluoreto de tetrabutilamônio; d) hidrogênio (gás), paládio 10% em carvão ativado; e) catecol, diisopropilazodicarboxilato. trifenilfosfina, f-1) Dimetilformamida, cloreto de fosforila, dicloroetano; f-2) cloridrato de hidroxilamina, piridina, anidrido acético, tetraidrofurano; f-3) 5 mol/L hidróxido de sódio, 30% peróxido de hidrogênio, dimetilsulfóxido; g) 1 mol/L hidróxido de sódio, metanol. INTX = produto de síntese número X.

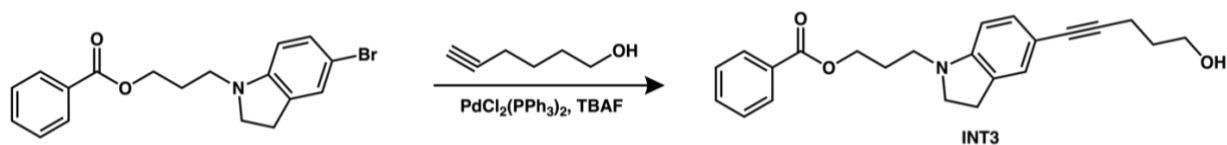


3-bromopropil benzoato (INT1) Ácido benzoico (18,3 g, 150 mmol), 3-bromopropan-1-ol (22,9 g, 165 mmol) e ácido *p*-toluenosulfônico (100 mg) foram diluídos em 10 mL de tolueno. A mistura foi colocada sob aquecimento a 95 °C e agitação até o dia seguinte. Após, o sistema foi resfriado

até temperatura ambiente e acetato de etila foi adicionado à mistura. A solução orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (três vezes) e solução saturada de cloreto de sódio (duas vezes), seca com sulfato de magnésio anidro e filtrada. A solução orgânica resultante foi concentrada e os resíduos remanescentes de solvente foram removidos sob alto vácuo, alcançando um rendimento de 60 % de 3-bromopropil benzoato, um óleo incolor (Mohr; Krout; Stoltz, 2009).

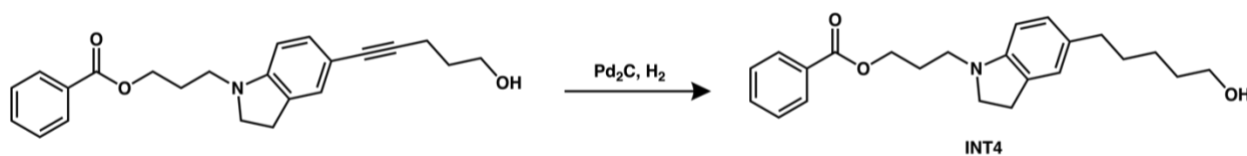


3-(5-bromoindolin-1-yl)propil benzoato (INT2) Em uma mistura de 5-bromoindolina (1,98 g, 10 mmol), dimetilamino piridina (0,12 g, 0,1 mmol) e trietil amina (5,6 mL, 40 mmol), foi adicionado 3-bromopropil benzoato cru (2,43 g, 10 mmol) em temperatura ambiente, e a massa reacional foi colocada sob agitação a 80 °C por 22 horas. A massa reacional foi resfriada a temperatura ambiente e diluída com acetato de etila e lavada duas vezes com água. À fase orgânica foi adicionada solução aquosa de ácido hidrocloreto a 10%. As fases foram separadas e a fase aquosa acídica foi extraída mais uma vez com acetato de etila. A fase orgânica resultante foi concentrada e o produto resultante foi cristalizado usando ácido hidrocloreto 20 % em álcool isopropílico (25 mL) e acetato de etila (20 mL), com rendimento de 53 % (Jain; Rao; Rao, 2012).

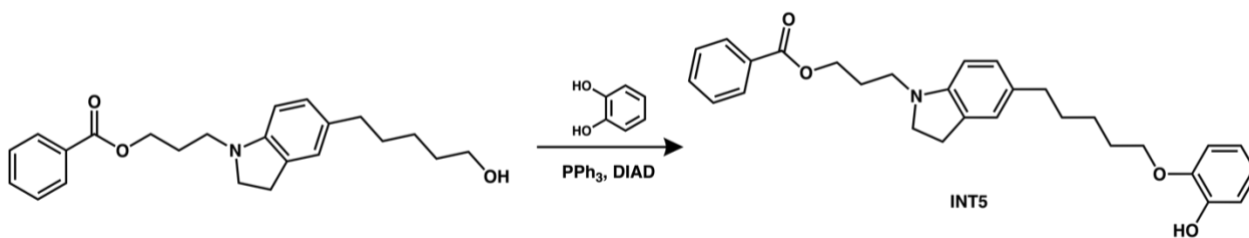


3-(5-(6-bromohex-1-in-1-il)indolin-1-il)propil benzoato (INT3) Uma mistura contendo (INT2) (0,362 g, 1 mmol), pent-4-in-1-ol (0,101 g, 1,2 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0,035 g, 5 mol%) e TBAF-3H₂O (0,839 g, 3 mmol) foi colocada sob N₂ em agitação a 80 °C por 48 horas. Após, foi adicionado acetato de etila à mistura, e a solução foi lavada quatro vezes com água e uma vez com solução saturada de cloreto de sódio. A mistura orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrado e concentrado. Houve significantes perdas de material nessa etapa, com grande dificuldade de remoção do composto da fase aquosa. O material obtido foi purificado por cromatografia rápida

em coluna (acetato de etila em hexanos, 10 a 30 %), para alcançar o produto, um líquido altamente viscoso esverdeado, com rendimento de 16 % (Liang; Xie; Li, 2006).



3-(5-(6-bromohexil)indolin-1-il)propil benzoato (INT4) Uma mistura de (INT3) (0,18 g, 0,5 mmol) em acetato de etila (7 mL) passou por remoção de gases por sonicação e vácuo por 2 minutos. Após, foi adicionado Pd/C (10 % wt, 0,07 g) ao meio e a atmosfera da mistura foi alterada para H₂ alternando entre vácuo e H₂ duas vezes. A reação foi agitada em temperatura ambiente com balão preenchido com H₂ durante a noite. No dia seguinte, a mistura foi filtrada por celite, concentrada e purificada por cromatografia em coluna rápida (10-20 % acetato de etila em hexanos) para alcançar o produto sob a forma de um denso óleo alaranjado, com 54,3 % de rendimento (Scott; Kuksa; Kubota, 2010).



3-(5-(5-(2-hidroxifenoxi)pentil)indolin-1-il)propil benzoato (INT5) Inicialmente azodicarboxilato de diisopropil (DIAD) (82,5 mg, 0,408 mmol) e PPh₃ (0,107 mg, 0,408 mmol) foram dissolvidos em THF seco (1,8mL) e a solução foi resfriada em banho de gelo e (INT4) (0,100 g, 0,272 mmol) foi adicionado. Essa mistura foi agitada por 10 minutos e, após esse tempo, uma solução de catecol (29,9 mg, 0,272 mmol) em THF seco (0,45 mL). Após 30 minutos sob agitação em baixa temperatura, a mistura foi aquecida para temperatura ambiente e mantida sob agitação. Quando a reação foi considerada completa (avaliação por cromatografia de camada delgada), a mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna rápida (30% acetato de etila em hexanos) (Wang *et al.*, 2010).

4.4.3 Avaliação dos produtos de síntese do derivado S23

Devido a dificuldades encontradas no processo de síntese, o derivado S23 não foi completamente sintetizado dentro do prazo esperado. No entanto, alguns produtos intermediários da síntese foram submetidos a avaliação frente às colinesterases conforme protocolo descrito na seção 4.3. A amostra com melhor perfil de inibição dual frente às colinesterases foi submetida a análises para determinação de viabilidade celular conforme seção 4.1 e ensaios celulares para identificação de atividade inibitória frente à BACE-1 seguindo protocolo descrito na seção 4.2. Adicionalmente, a estrutura correspondente à amostra com melhor perfil de inibição foi analisada por simulações de DM conforme descrito na seção 4.4.1.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O reposicionamento de fármacos tem se destacado na área de inovação e pesquisa farmacêutica como uma estratégia importante, uma vez que possibilita a identificação de novos usos terapêuticos para fármacos existentes além da sua indicação original (Saranraj; Kiran, 2024). Essa abordagem utiliza conhecimento farmacêutico e dados clínicos existentes para acelerar o desenvolvimento de novos tratamentos, e tem se beneficiado do desenvolvimento de técnicas computacionais e ferramentas *in silico* para planejamento racional de fármacos.

A realização de um estudo prévio utilizando ferramentas *in silico* para priorização de novos candidatos a fármacos multialvos para tratamento da doença de Alzheimer identificou silodosina (ZINC ID 3806063), um fármaco aprovado pela FDA que é usado para tratar indivíduos com distúrbios urológicos (Jindan; Xiao; Liping, 2022), como um potencial inibidor triplo das enzimas AChE, BuChE e BACE-1 (Barbosa *et al.*, 2023). Nesse trabalho, Barbosa e colaboradores (2023) realizaram a construção e validação de um modelo farmacofórico com requisitos estruturais para inibição tripla, o qual foi utilizado para triagem virtual ($QFIT_{\text{Silodosina}} = 31,67$), seguido de triagem virtual por acoplamento molecular (Pontuação_{AChE} = -8,0 kcal/mol; Pontuação_{BuChE} = -8,1; Pontuação_{BACE-1} = 43,55) e predição de parâmetros físico-químicos.

A avaliação *in silico* realizada por Barbosa e colaboradores (2023) demonstrou que silodosina possui os requisitos estruturais descritos na literatura para inibição tripla. No entanto, dados *in silico* não são suficientes para atestar atividade biológica e, por esse motivo, são necessários ensaios *in vitro* para avaliação preliminar do perfil de atividade biológica da silodosina frente aos três alvos, bem como o perfil de segurança/toxicidade em meio celular para a nova indicação através do ensaio de viabilidade celular

5.1 DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR

A avaliação de toxicidade consiste em uma etapa fundamental e de caráter limitante na priorização de moléculas candidatas a fármacos. Em se tratando de fármacos com efeito a nível cerebral, é possível realizar análise de neurodegeneração através da avaliação dos efeitos químicos de compostos em linhagens celulares derivadas de roedores ou de humanos e, para tal, as células PC12 do feocromocitoma de ratos tem sido amplamente utilizada (Wiatrak *et al.*, 2020). Essas

células estão relacionadas à secreção neuronal de catecolaminas, dopamina e norepinefrina, são facilmente cultivadas e seu processo de diferenciação está claramente elucidado. Por esse motivo, as células PC12 foram utilizadas para avaliar se a silodosina apresenta um perfil de segurança apropriada para tratar pacientes com DA (Figura 8).

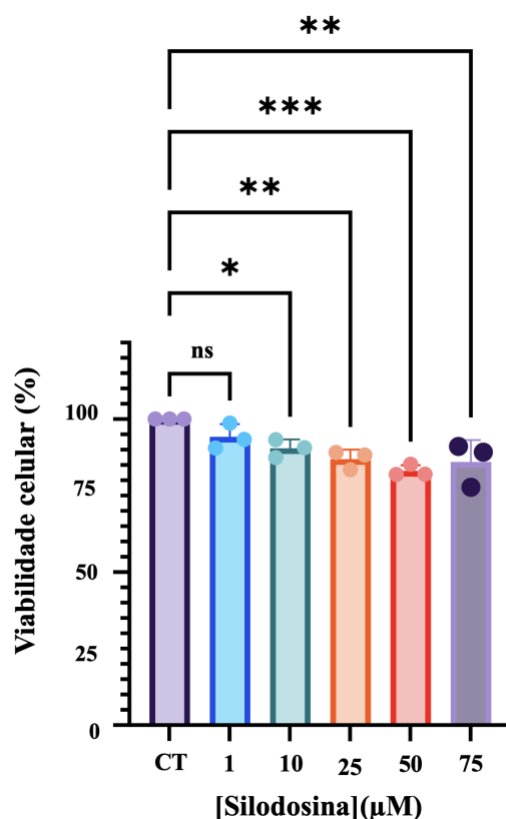


Figura 8. Efeito da silodosina na viabilidade de células PC12 determinado através de MTT. Gráfico de viabilidade em percentual em condições Controle (CT) e tratada com silodosina nas concentrações de 1 - 75 μ M por ensaio de MTT em 24 horas. Análise estatística realizada utilizando o teste One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de múltipla comparação Bonferroni. N=3. ns = não significativo estatisticamente; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

A exposição a diferentes concentrações de silodosina por 24 horas demonstrou efeitos dose-dependente nas células PC12. Em concentrações inferiores a 10 μ M da amostra não foi observada redução significativa na viabilidade celular (Figura 8), mas concentrações superiores demonstraram efeito tóxico/citostático. Adicionalmente à possibilidade de uso para avaliação de toxicidade, as células PC12 ainda são capazes de expressar a BACE-1, a qual desempenha um papel fundamental na secreção de neurotransmissores e regulação de exocitose nessas células (Lee

et al., 2007; Zhang *et al.*, 2011) e, por esse motivo, a linhagem de células PC12 foi também utilizada para identificação de atividade anti-BACE-1.

5.2 ENSAIOS CELULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-BACE-1

A identificação de atividade anti-BACE-1 foi realizada através de um método de fluorescência no qual a atividade enzimática a nível celular é proporcional à intensidade da fluorescência emitida. Tal método vem sendo amplamente utilizado em testes para detecção de atividade de BACE-1 e deposição de peptídeos β A (Afghah *et al.*, 2024; Oh *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2023) uma vez que sua abordagem de leitura de fluorescência resolvida no tempo (do inglês, *time-resolved fluorescence*) minimiza a interferência do composto (Porcari *et al.*, 2005). Adicionalmente, o emprego de estratégias que avaliam a atividade a nível celular permite analisar interações moleculares e a avaliação da atividade sob condições mais próximas do que ocorre em meio fisiológico, permitindo uma análise mais acurada (Incaviglia *et al.*, 2021). Com base no perfil de toxicidade observado na seção anterior, a concentração de 3 μ M foi selecionada para este ensaio, uma vez que não compromete a viabilidade celular.

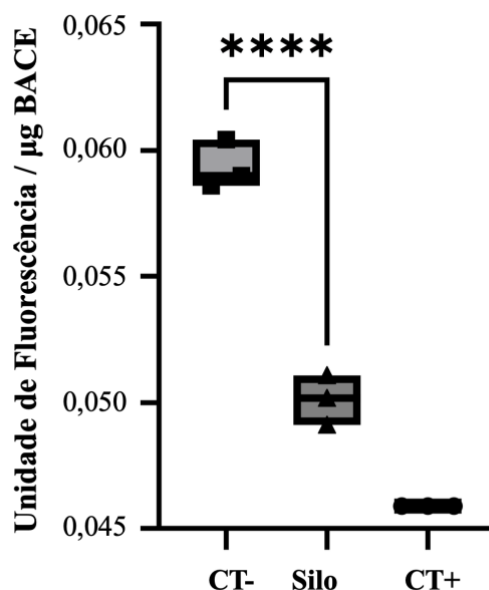


Figura 9. Efeito da silodosina a na atividade enzimática de BACE-1 em células PC12 determinado por ensaio celular (KIT MAK237). CT- (Controle negativo) = extrato da proteína de células PC12 tratadas com 0,3% DMSO por 24 horas + substrato; Silo = extrato de proteína de células PC12 tratado com 3 μ M de silodosina por 24 horas + substrato; CT+ (Controle positivo) = extrato de proteína de células PC12 tratado com 0,03% DMSO por 24 horas + inibidor padrão contido no kit + substrato.

Os ensaios realizados permitiram observar que a silodosina a 3 μM foi capaz de reduzir a atividade da BACE-1 quando comparada ao controle positivo, e apresentou valores de fluorescência próximos ao que foi observado na amostra tratada com um inibidor padrão (Figura 9). Esse resultado ressalta que a silodosina possui atividade anti-BACE-1 em concentração considerada segura de acordo com os testes de viabilidade celular. No entanto, tendo em vista o aspecto multifatorial que envolve a patogênese da DA, a modulação exclusiva de um alvo não corresponde à hipótese mais adequada para tratamento. Por esse motivo, para avaliar o seu potencial multialvo, a silodosina foi testada frente às colinesterases.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

A avaliação da atividade anticolinesterásica foi realizada através de ensaios nos quais é possível mensurar a formação de produtos de catálise baseados no princípio de colorimetria na região da luz visível. O método descrito por Ellman e colaboradores (1961) pode ser realizado de maneira relativamente rápida, com baixo custo, utiliza quantidade reduzida de reagentes, oferece resultados confiáveis e reprodutíveis, e ainda é capaz de avaliar atividade de ambas as colinesterases, AChE e BuChE (De A Cavalcante *et al.*, 2018; Ercetin *et al.*, 2020; Pohanka; Hrabínova; Kuca, 2008). A realização desses testes permitiu identificar que silodosina apresenta atividade anti-AChE na faixa do alto micromolar ($\text{IC}_{50} > 500,0 \mu\text{M}$), porém apresenta efeitos de inibição satisfatórios frente à BuChE ($\text{IC}_{50} = 3,02 \pm 0,05 \mu\text{M}$, Figura 10).

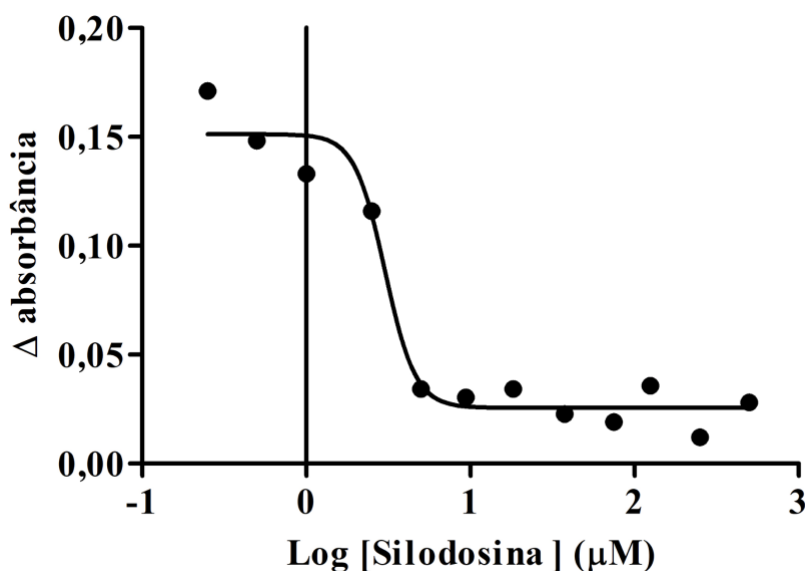


Figura 10. Curva concentração-resposta do efeito anticolinesterásico *in vitro* de silodosina frente à BuChE

O cálculo do IC₅₀ sugere que concentrações reduzidas de silodosina são capazes de inibir a atividade catalítica da BuChE, apesar da reduzida afinidade frente à AChE. Esse resultado é similar ao observado em estudos de inibição dual previamente realizados, nos quais substâncias testadas possuem melhor perfil de inibição frente à BuChE (Cavdar *et al.*, 2019; de Almeida *et al.*, 2021; de Almeida, R. B. M. *et al.*, 2023; Guo *et al.*, 2020; Jończyk *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023). Esse fato pode ser atribuído à diferença de volume dos sítios ativos, uma vez que AChE tem o sítio ativo relativamente pequeno ($\sim 302 \text{ \AA}^3$) quando comparado ao sítio da BuChE ($\sim 502 \text{ \AA}^3$) (Figura 2) (Darvesh; Hopkins; Geula, 2003). Adicionalmente, a molécula testada é volumosa ($\sim 199 \text{ \AA}^3$) e o sítio ativo de AChE é composto por resíduos aromáticos, o que reduz a disponibilidade de espaço para que o inibidor se acomode. Assim, essas características podem conferir seletividade para o inibidor frente a BuChE.

Estudos apontam a inibição seletiva da BuChE como responsável por melhorias cognitivas e de memória e por isso consiste em uma alternativa interessante para o tratamento da DA, especialmente em estágios avançados. Esse efeito decorre da existência de um efeito compensatório da BuChE que pode chegar a 120% de sua atividade em condições fisiológicas em resposta à redução da atividade da AChE à medida que a doença progride (Li *et al.*, 2022; Panek *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2021).

Todavia, apesar da silodosina apresentar resultados de inibição promissores que indicam a possibilidade de uso como fármaco para terapia da DA, o objetivo desse estudo consiste na identificação de moléculas com potencial atividade multialvo frente a ambas as colinesterases e BACE-1. Uma vez que as informações extraídas a partir dos dados biológicos não são suficientes para avaliar os resultados do ponto de vista atomístico das interações entre o candidato a fármaco e os alvos biológicos e por conseguinte, propor hipóteses que justifiquem os mecanismos de ação, é possível utilizar estratégias computacionais que permitam identificar essas interações e propor modelos de interação ligante-macromolécula. Dentre essas estratégias, as simulações de dinâmica molecular podem ser usadas em associação aos ensaios biológicos para guiar o planejamento racional de novos fármacos derivados da silodosina, com o intuito de otimizar a estrutura original.

5.4 PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DA SILODOSINA

5.4.1 Planejamento de derivados da silodosina

5.4.1.1 Simulações de dinâmica molecular

Simulações de DM permitem avaliar o comportamento molecular em função do tempo, assumindo ambos ligante e macromolécula como flexíveis e considerando o conteúdo da estrutura secundária e a orientação das cadeias laterais (Dandekar; Sinha; Mondal, 2021; Oliveira *et al.*, 2018). Nesse trabalho, as simulações de DM avaliaram a estabilidade da silodosina no sítio ativo das enzimas (AChE, BuChE e BACE-1), as interações intermoleculares que são responsáveis por esse comportamento e os parâmetros termodinâmicos envolvendo os complexos, de modo a extrair informações para guiar o planejamento de derivados da silodosina.

Com o intuito de avaliar a estabilidade dos sistemas durante as simulações de DM, foi analisado inicialmente o desvio médio quadrático (do inglês, *Root Mean Square Deviation* – RMSD) (Figura 11), uma métrica que avalia a estabilidade estrutural do sistema através das alterações conformacionais na estrutura da proteína, em comparação à estrutura de partida (Sargsyan; Grauffel; Lim, 2017).

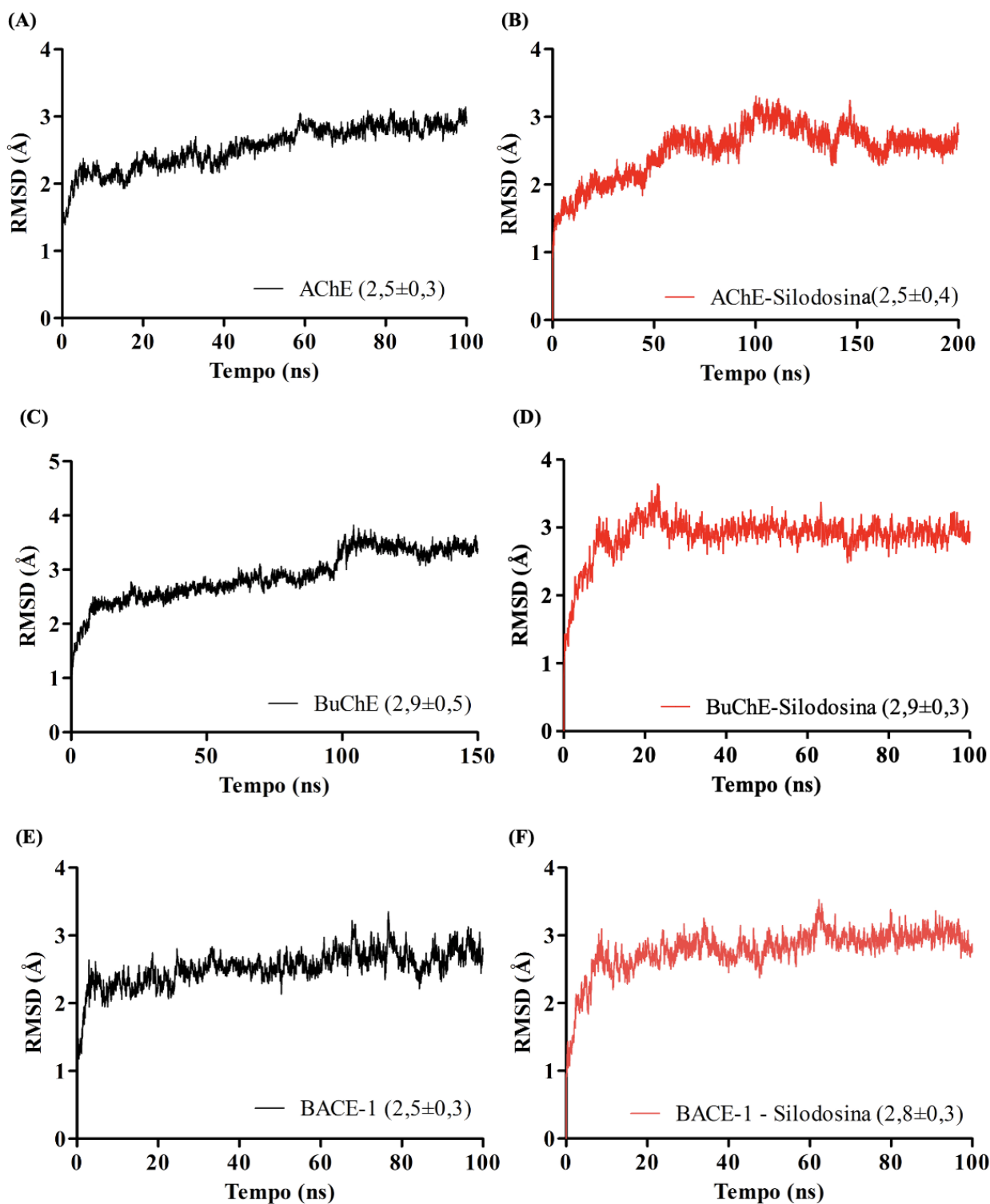


Figura 11. RMSD para a cadeia principal (*backbone*) durante as trajetórias das simulações de DM dos sistemas de AChE (A – APO; B – complexo), BuChE (C – APO; D – complexo), e BACE-1 (E – APO; F – complexo). Entre (), valor médio e desvio padrão de RMSD durante a trajetória.

A avaliação do RMSD também permite identificar na trajetória o momento em que o sistema atinge o equilíbrio nas alterações conformacionais (Sargsyan; Grauffel; Lim, 2017). Na maior parte dos casos, é possível observar a ocorrência de um aumento progressivo no valor de RMSD nos estágios iniciais até que o sistema estabilize, e variações de RMSD inferiores a 3,0Å são consideradas adequadas (Bowman, 2016; Verli, 2014). Nas simulações deste estudo foi possível observar a ocorrência de equilíbrio anterior aos 100 ns de simulação nos sistemas contendo a proteína na sua forma APO para AChE ($\Delta t = 40$ ns) e para BACE-1 ($\Delta t = 60$ ns) porém o mesmo não foi observado para a BuChE, cuja simulação precisou ser estendida até 150 ns ($\Delta t = 40$ ns). Nos sistemas contendo o ligante, por sua vez, as simulações alcançaram equilíbrio inicialmente para BuChE ($\Delta t = 75$ ns) e para BACE-1 ($\Delta t = 35$ ns). Para o sistema contendo AChE complexado com silodosina, em contrapartida, uma simulação de 100 ns não foi suficiente para observar o tempo de estabilização. Por esse motivo, a simulação foi estendida para 200 ns, e assim foi possível observar que o sistema atingiu equilíbrio aos 165 ns de simulação ($\Delta t = 35$ ns). Esse resultado está alinhado ao que foi observado no teste de inibição, no qual a molécula investigada não foi capaz de inibir a atividade enzimática apropriadamente, e sugere que esse efeito pode ser resultado da reduzida habilidade de estabelecer interações com força suficiente para estabilizar o sistema nos estágios iniciais.

O RMSD consiste em uma avaliação métrica que traz informações importantes acerca das simulações de DM, a qual considera toda a estrutura da proteína. No entanto, essa informação não é suficiente para garantir a estabilidade do sistema, visto que não considera a flutuação que ocorre em regiões específicas da proteína, como o sítio ativo. Dessa forma, adicionalmente à avaliação de RMSD, as flutuações atômicas podem ser avaliadas individualmente através do cálculo da flutuação quadrática média (do inglês, *Root Mean Square Fluctuation* – RMSF). Por esse motivo, foram gerados gráficos exibindo as flutuações por resíduo das formas APO em comparação à respectiva forma complexada, durante a fase produtiva (Figuras 12, 13 e 14).

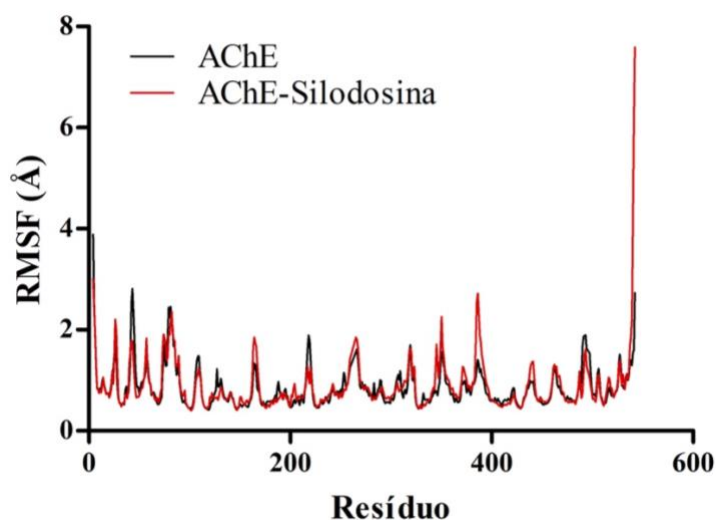


Figura 12. RMSF (Å) (*backbone*) de AChE nas formas APO e complexada com silodosina durante a fase produtiva ($\Delta t = 35\text{ns}$).

Os dados revelam que a flutuação atômica do complexo com AChE ($\text{RMSF} = 0,9 \pm 0,5 \text{ \AA}$) é estatisticamente similar às flutuações da forma APO ($\text{RMSF} = 0,8 \pm 0,4 \text{ \AA}$) (Figura 12). As regiões do sítio ativo seguem um perfil similar de flutuações em ambos os sistemas, o que sugere que a presença do ligante não promove alterações conformacionais significativas na estrutura da proteína. As regiões com maior flutuação correspondem a regiões de alça, as quais são caracterizadas por elevada flexibilidade conformacional.

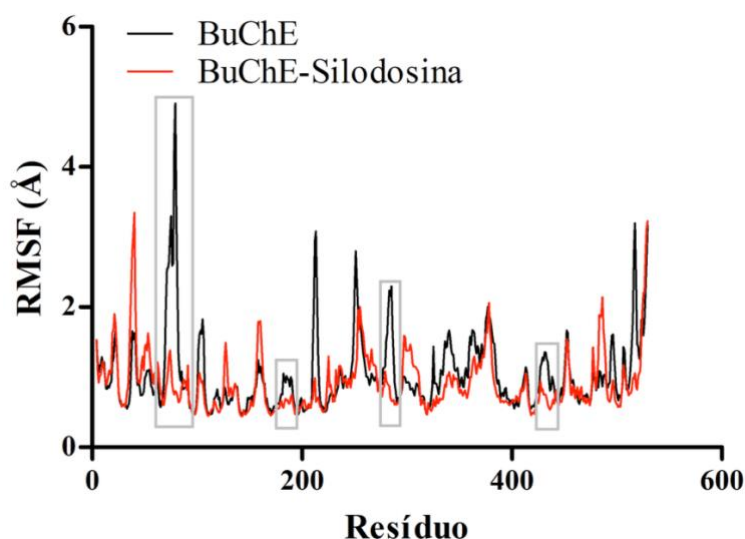


Figura 13. RMSF (Å) (*backbone*) de BuChE nas formas APO e complexada com silodosina durante a fase produtiva ($\Delta t = 75\text{ns}$). Os destaques em cinza correspondem a regiões que compreendem o sítio ativo.

Por outro lado, as flutuações atômicas da forma APO de BuChE ($\text{RMSF} = 1,0 \pm 0,5 \text{ \AA}$) e complexada ($\text{RMSF} = 0,8 \pm 0,3 \text{ \AA}$) sugerem que o segundo sistema é mais estável (Figura 13). Essa consideração é evidenciada quando são observadas as regiões do sítio ativo destacadas no gráfico, nos quais o sistema sem o ligante apresenta flutuações mais evidentes. Esses dados parecem estar alinhados aos resultados dos testes enzimáticos, uma vez que alterações conformacionais no sítio ativo são primordiais para catálise da BuChE (Fang *et al.*, 2011).

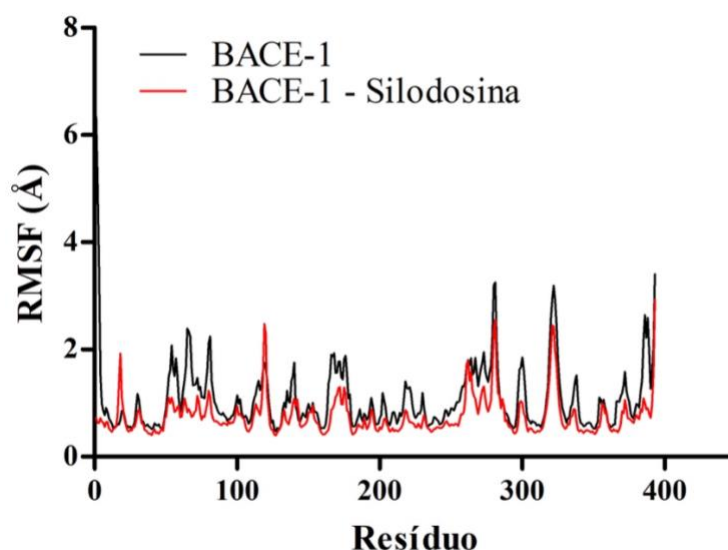


Figura 14. RMSF (Å) (*backbone*) de BACE-1 nas formas APO e complexada com silodosina durante a fase produtiva ($\Delta t = 75\text{ns}$).

Nos sistemas envolvendo a BACE-1, por sua vez, os efeitos do ligante nas flutuações entre a forma APO ($\text{RMSF} = 1,1 \pm 0,4 \text{ \AA}$) e complexada com silodosina ($\text{RMSF} = 0,7 \pm 0,4 \text{ \AA}$) são ainda mais pronunciados, o que sugere maior estabilidade para a forma complexada (Figura 14). A região dos resíduos catalíticos apresenta reduzida flutuação em ambos os sistemas, o que indica que não ocorrem alterações significativas na conformação do sítio ativo durante as simulações. No entanto, é possível observar maior flutuação na região entre os resíduos Val67-Glu77 no sistema APO comparado ao sistema complexado, o que sugere que silodosina desencadeia interações que podem impedir a abertura da alça *flap* e inibir a atividade catalítica da BACE-1, similar ao observado em outras simulações de DM previamente descritas (do Bomfim *et al.*, 2022).

A análise do RMSD e RMSF demonstram que silodosina possui características moleculares que permitem a estabilização da estrutura de AChE, BuChE e BACE-1, apesar da estabilização do

sistema com AChE ocorrer em estágios avançados da simulação. A estabilização decorre de interações intermoleculares que são estabelecidas entre ligante e aminoácidos (resíduos) importantes da proteína, e essas interações podem estar envolvidas com a resposta biológica. Dentre as diversas interações, as ligações de hidrogênio são consideradas importantes para a biologia por ser capaz de estabilizar duas moléculas em uma estrutura fundamental de complexo (Buckingham; Del Bene; McDowell, 2008). Uma vez que essas interações são transitórias, elas são analisadas considerando a permanência das mesmas durante o tempo de simulação e, nesse estudo, foram consideradas aquelas com permanência superior a 10% do tempo da fase produtiva (Figura 15) (para fins de padronização, foi considerada a fase produtiva como os 35 ns finais das simulações).

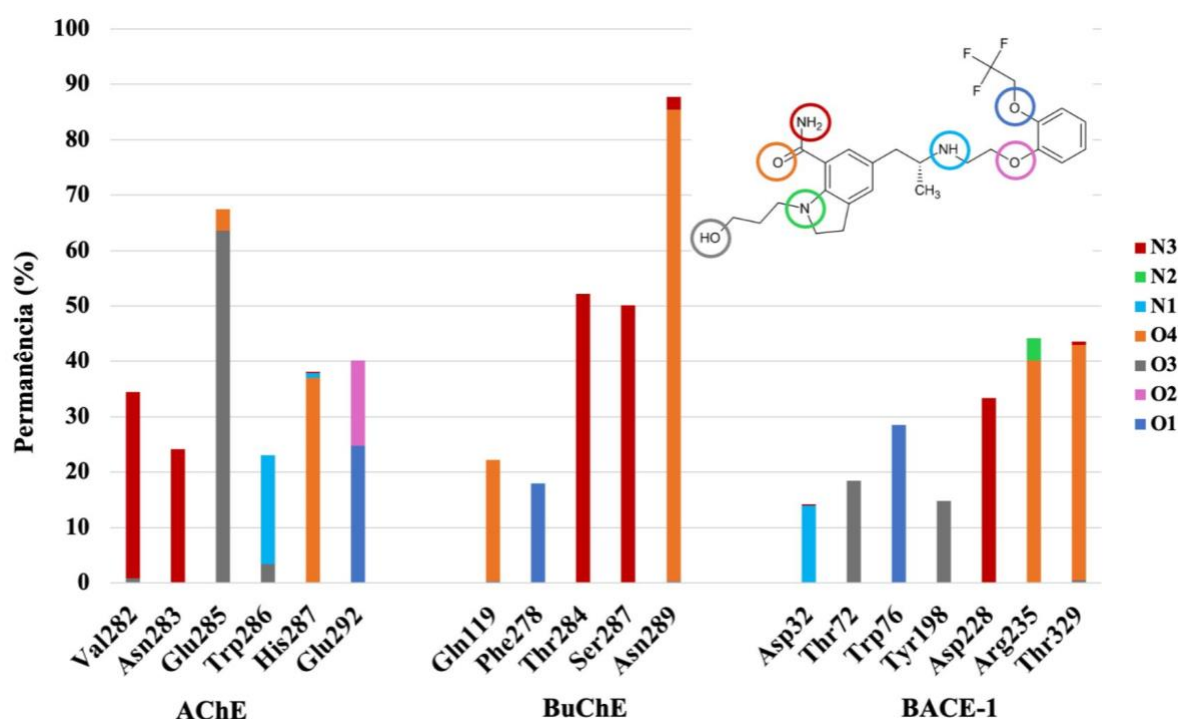


Figura 15. Permanência das interações de hidrogênio da silodosina no sítio ativo de AChE, BuChE e BACE-1 durante a fase produtiva das simulações de DM e identificação dos pares envolvidos.

No sítio ativo de AChE foi possível observar que o oxigênio da hidroxila da cadeia lateral da silodosina atua como doador em ligações de hidrogênio com os oxigênios carboxílicos de Glu285, totalizando 63,5% de permanência. Adicionalmente, a amina presente em Trp286 interage com a amina terciária do ligante (19%); o nitrogênio da amida ligada à indolina estabelece ligações

de hidrogênio com átomos de oxigênio presentes em Val282 (33,6%) e Asn283 (24,1%), nos quais o nitrogênio do ligante atua como doador; e os oxigênios ligados ao anel aromático atuam como doador em ligações de hidrogênio com o nitrogênio de Glu292 (40,2%). No sítio ativo de BuChE, por sua vez, importantes ligações de hidrogênio são estabelecidas entre o oxigênio da formamida e o grupo amino de Gln119 (21,9%) e o nitrogênio da cadeia lateral de Asn289 (85,2%), nas quais o átomo do ligante atua majoritariamente como doador; e o nitrogênio do mesmo grupo atua como receptor de ligação estabelecida com Thr284 (52,1%) e com Ser287 (50,1%). É possível ainda observar interações de hidrogênio entre o oxigênio da hidroxila da silodosina e Phe278 (17,9%). Em ambas as colinesterases é possível observar que os resíduos envolvidos em ligações de hidrogênio de longa permanência são resíduos localizados na região periférica dos sítios ativos (De Boer *et al.*, 2021), o que sugere que o ligante pode competir com o substrato para entrada no sítio ativo. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que essas interações não são suficientes para estabilizar complexos com AChE, para os quais as interações entre o ligante e resíduos localizados na cavidade e na região catalítica são imprescindíveis (El-Hussieny *et al.*, 2023; Ozten *et al.*, 2021).

No sítio ativo de BACE-1 são observadas ligações de hidrogênio durante mais que 10% da fase produtiva com a díade catalítica, entre o nitrogênio da amina terciária e Asp32 (14,0%) e entre o nitrogênio da formamida e Asp228 (33,3%). Tais interações são descritas em estudos anteriores realizados com inibidores de BACE-1 (Tran *et al.*, 2020; Yildiz, 2020) e isso pode estar associado ao perfil de inibição apresentado por silodosina (Figura 9). Os resíduos localizados na região da alça *flap* também estão envolvidas em ligações de hidrogênio, como a Thr72 e o oxigênio da hidroxila (18,5%) do N-propanol, e o oxigênio do trifluoroetanol realiza ligações de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia lateral de Trp76 (28,5%). Adicionalmente, o oxigênio da hidroxila está envolvido em ligações de hidrogênio com a hidroxila lateral de Tyr198 (14,8%) e o oxigênio da formamida atua como acceptor em interações com Arg235 (40,2%) e Thr329 (42,5%).

Apesar de as ligações de hidrogênio serem importantes para a estabilização dos sistemas, essas interações não são as únicas responsáveis pela manutenção das estruturas e da resposta biológica. Por esse motivo, é importante avaliar as interações de outras naturezas que podem ser estabelecidas entre ligante e proteína. Ao considerar o aspecto dinâmico das simulações, a análise dessas interações deve ser feita através da análise de estruturas representativas que representem o estado conformacional mais comum ou energeticamente favorável. Nesse estudo, as estruturas

representativas escolhidas para cada sistema foram a conformação no tempo 190,45 ns para AChE-silodosina, 85,25 ns para BuChE-silodosina e 88,3 ns para BACE-1-silodosina (Figuras 16, 17 e 18).

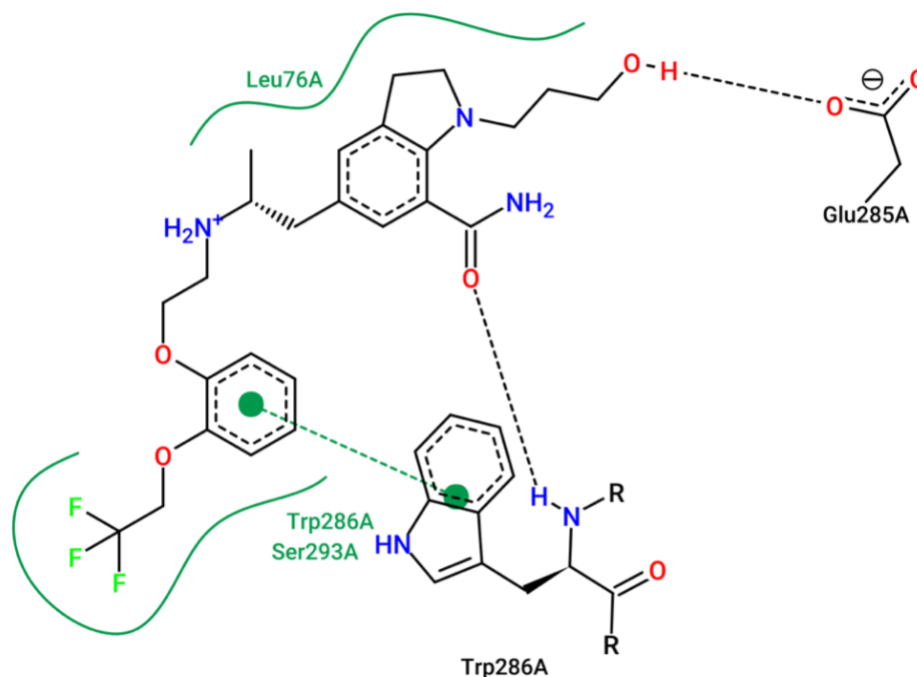


Figura 16. Interações da silodosina no sítio ativo de AChE obtido da estrutura representativa da simulação de DM ($t = 190,45$ ns). Contornos em linha verde sólida representam interações hidrofóbicas; linhas verdes tracejadas representam interações do tipo empilhamento π ; linhas pretas tracejadas representam ligações de hidrogênio.

O mapa de interações da estrutura representativa da silodosina complexada com AChE (Figura 16) revela que o grupo trifluoroetanol é capaz de estabelecer interações hidrofóbicas com os resíduos Trp286 e Ser293. O anel aromático do grupo catecol interage com o anel aromático da cadeia lateral de Trp286 através de uma ligação do tipo empilhamento π , e essa interação parece ser importante para inibição de AChE (Honorio *et al.*, 2021; Van Der Westhuizen *et al.*, 2022). O grupamento indolina do ligante também estabelece interações hidrofóbicas com o resíduo Leu76. O mapa ilustra ainda duas ligações de hidrogênio, entre a hidroxila do N-propanol lateral à indolina e a carboxila lateral de Glu285 – que atua como receptor da ligação –, e entre o oxigênio aceptor da formamida e a amina presente em Trp286. Apesar de silodosina ser capaz de estabelecer interações descritas em inibidores conhecidos da AChE, é importante salientar que os resíduos envolvidos nas interações descritas correspondem a resíduos localizados na região periférica do sítio ativo. Estudos anteriores demonstraram que essas interações são importantes para inibição das

colinesterases (Niu *et al.*, 2005) mas, se não ocorrem interações na base do sítio ativo, o complexo ligante-macromolécula possivelmente não estabilizará. Esse fato pode estar associado ao que foi observado na análise de RMSD do complexo AChE-silodosina (Figura 11) – o qual demonstrou estabilização do sistema apenas após 165 ns de simulação – e à baixa afinidade de inibição frente a AChE observada nos ensaios *in vitro*.

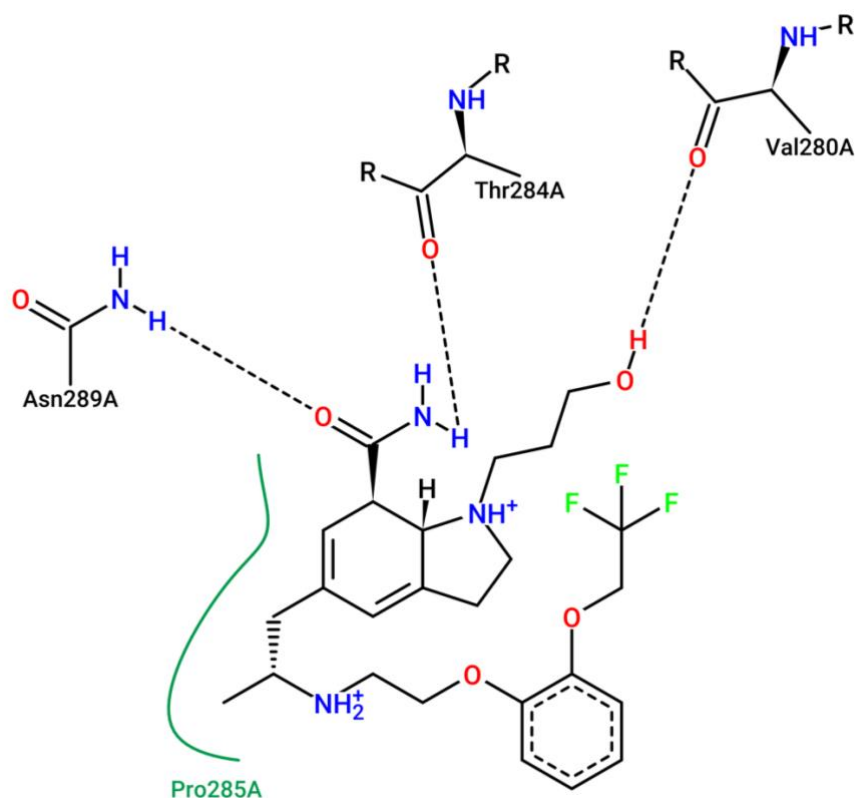


Figura 17. Interações da silodosina no sítio ativo de BuChE obtido da estrutura representativa da simulação de DM ($t = 85,25$ ns). Esquema de cores similar à Figura 16.

O mapa de interações da estrutura representativa de BuChE complexada com silodosina (Figura 17) ilustra que a região do grupamento indolina estabelece interações hidrofóbicas com Pro285, resíduo que tem sido observado em interações com inibidores da BuChE (Liu *et al.*, 2022; Shakil; Fahd, 2021). Além das interações hidrofóbicas, ainda são observadas ligação de hidrogênio entre o oxigênio da formamida e a amina do resíduo Asn289, a qual apresenta permanência superior a 80% (Figura 15). Essa interação também foi reportada como importante para a inibição da BuChE, uma vez que está relacionada à manutenção do inibidor no interior do sítio ativo e bloqueio

do acesso do substrato (Zhang *et al.*, 2020). Adicionalmente, a amina do grupo formamida atua como doador de ligação de hidrogênio com o oxigênio carboxílico de Thr284, e a hidroxila da cadeia lateral à indolina atua como doador de ligação de hidrogênio com o oxigênio carboxílico de Val280.

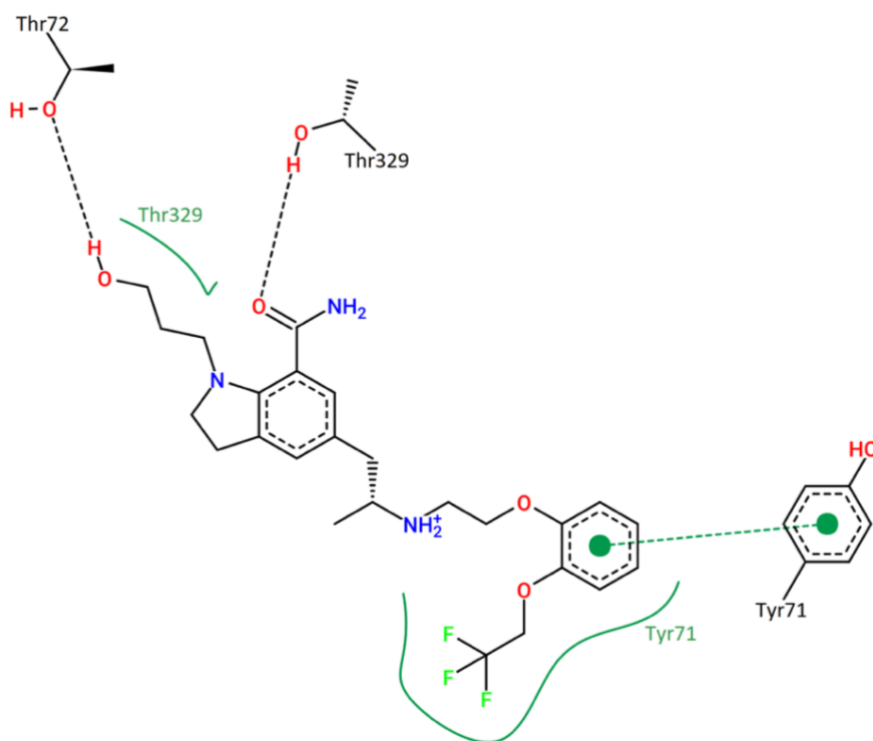


Figura 18. Interações da silodosina no sítio ativo de BACE-1 obtido da estrutura representativa da simulação de DM (t = 88,3 ns). Esquema de cores similar à Figura 16.

O mapa de interações da estrutura representativa da silodosina complexada com BACE-1 (Figura 18) ilustra ligações de hidrogênio entre o hidrogênio da hidroxila no N-propanol de silodosina com o oxigênio da cadeia lateral de Thr72 e entre o oxigênio do grupo formamida de silodosina e o hidrogênio da hidroxila lateral de Thr329, nas quais o ligante atua como doador e receptor de ligação, respectivamente. O resíduo Thr329 também estabelece interações hidrofóbicas com o N-propanol lateral ligada a indolina do ligante. Adicionalmente, o anel catecol de silodosina estabelece interações do tipo empilhamento *pi* com o anel aromático presente em Tyr71 e o grupamento trifluoroetanol também estabelece interações hidrofóbicas com Tyr71. Os resíduos Tyr71 e Thr72 são considerados relevantes para o desenvolvimento de inibidores de BACE-1, uma

vez que são localizados na alça *flap* e são responsáveis pelas alterações conformacionais necessárias para atividade catalítica (do Bomfim *et al.*, 2022), o que sugere que essas interações são fundamentais para o resultado observado nos ensaios celulares.

É importante salientar uma mudança significativa observada quando comparados o perfil de interações intermoleculares nas simulações de DM aos estudos de acoplamento molecular envolvendo silodosina e AChE, BuChE e BACE-1 (Barbosa *et al.*, 2023). Isso se dá devido ao fato de a DM considerar a flexibilidade da proteína. No caso de BuChE, foi possível observar interações de longa permanência que são fundamentais para a inibição da atividade catalítica e que não estavam contidas no mapa de interações do acoplamento molecular. No caso de BACE-1, apesar de o acoplamento molecular ilustrar interações com Asp32 e o mapa da estrutura representativa da DM não, a análise das interações de hidrogênio (Figura 15) mostrou que ambos Asp32 e Asp228 estão envolvidas em interações de longa permanência, o que reflete o perfil de inibição da atividade catalítica.

Apesar da importância das interações intermoleculares, a maior parte dos processos moleculares (incluindo associações e reações químicas) são guiadas por energia livre de ligação (Wang *et al.*, 2019). Desse modo, a força de uma interação biomolecular como a envolvida no reconhecimento para inibição pode ser quantificada pela avaliação da energia livre (Kumari; Kumar; Lynn, 2014) e, por essa razão, é importante avaliar os aspectos termodinâmicos dos complexos entre silodosina e os três alvos. Uma vez que os programas de acoplamento molecular não consideram a flexibilidade das proteínas e simplificam as funções de energia (Hamed, 2020), o método de mecânica molecular *Poisson Boltzmann* (MM/PBSA) foi aplicado para a fase produtiva das simulações dos sistemas envolvendo os complexos (Tabela 2).

Tabela 2. Energia livre de ligação e componentes calculados pelo g_mmpbsa.

Sistema	E_{vdW} (kJ/mol)	E_{elec} (kJ/mol)	G_{MM} (kJ/mol)	G_{polar} (kJ/mol)	$G_{nonpolar}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{binding}$ (kJ/mol)
AChE-silodosina	-0,001	0,046	0,045	-1,313	-3,854	-1,489
BuChE-silodosina	-167,952	-24,197	-192,149	115,276	-4,224	-93,422
BACE-1-silodosina	-24,429	-4,179	-28,608	15,106	1,605	-15,768

O MM/PBSA corresponde a uma estratégia versátil que permite estimar a energia livre de ligação e alcança um equilíbrio interessante entre acurácia nos resultados e eficiência (Valdés-Tresanco *et al.*, 2021). Ao utilizar esse método, é possível observar que a energia livre de ligação

entre AChE e silodosina corresponde a -1,489 kJ/mol, e as interações de van der Waals não são significantes para a estabilização do complexo. Esses resultados ilustram que não há propensão de ocorrer associação entre o ligante e a proteína e corrobora o que foi observado nos testes *in vitro*, nos quais silodosina não apresentou habilidade de inibir a atividade catalítica de AChE. Paralelamente, estudos prévios utilizando como referência compostos com atividade inibitória frente a AChE, como galantamina ($E_{vdW} = -146,8$ kJ/mol; $\Delta G_{binding} = -68,3$ kJ/mol) e rivastigmina ($E_{vdW} = -127,5$ kJ/mol; $\Delta G_{binding} = -113,1$ kJ/mol), mostraram valores melhores de energia livre e de contribuição de van der Waals (Pascoini *et al.*, 2019) do que o observado na simulação com silodosina. A análise de decomposição de energia por resíduo confirma esses resultados (Figura 19), a qual indica que a contribuição individual por resíduo foi insuficiente para estabilizar o complexo, e os resíduos com maior contribuição foram aqueles localizados fora do sítio de ligação.

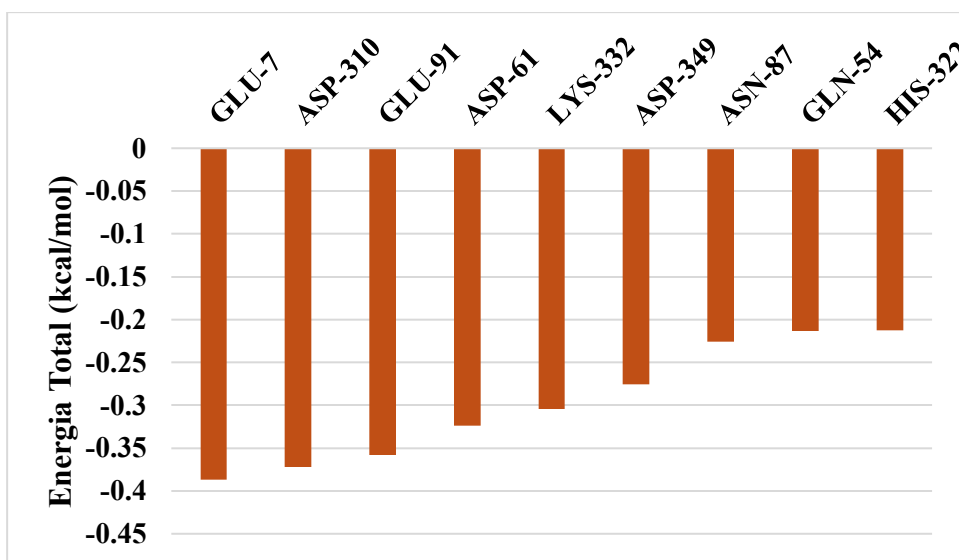


Figura 19. Decomposição por resíduo da energia livre de ligação para o complexo AChE-silodosina, calculado usando o método MM/PBSA durante a fase produtiva ($\Delta G < -0,2$ kcal/mol)

Por outro lado, a energia livre de ligação do complexo de BuChE-silodosina corresponde a -93,422 kJ/mol (Tabela 2), o que está alinhado à estabilidade atingida pelo sistema e aos dados de inibição *in vitro*. Esse valor demonstra que o composto é capaz de criar um sistema com BuChE mais estável que donepezila e outros compostos ativos, e as interações de van der Waals desempenham um papel essencial nesse processo, similar ao descrito em estudos anteriores (Adalat *et al.*, 2023; Al-Joufi *et al.*, 2022). As interações de ligação de hidrogênio também estão envolvidas

no processo de estabilização do sistema. A análise de decomposição de energia por resíduo (Figura 20), por sua vez, corrobora com interações observadas previamente (Figura 17), demonstrando que tais interações são prováveis de ocorrer e contribuem para a estabilização do complexo, uma vez que resíduos como Val280 e Pro285 demonstraram significativa contribuição de energia. Contribuições importantes também foram associadas a resíduos localizados no sítio ativo, como Trp82, Leu286, Val288 e Tyr332.

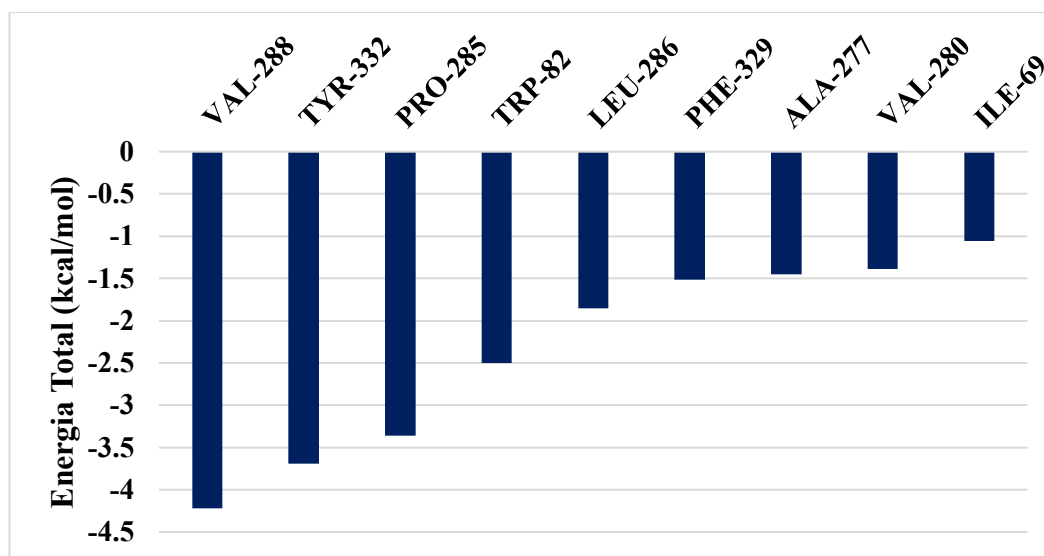


Figura 20. Decomposição por resíduo da energia livre de ligação para o complexo BuChE-silodosina, calculado usando o método MM/PBSA durante a fase produtiva ($\Delta G < -0,1$ kcal/mol).

Para o sistema com BACE-1, foi observado que a energia livre de ligação foi de -15,768 kJ/mol e as interações de van der Waals contribuem significativamente para a estabilização (Tabela 2). Além disso, ligações de hidrogênio parecem ser importantes para a estabilização do sistema, o que corrobora a longa permanência das interações (Figura 15). Esses resultados são similares ao observado em simulações de DM de inibidores da BACE-1 (Gutiérrez *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2023), o que pode estar associado aos resultados de atividade biológica frente à BACE-1. A análise de decomposição por resíduo (Figura 21), por sua vez, sugere que a contribuição individual não é suficiente para estabilizar o complexo porém, mesmo com essa limitação, o Asp32 catalítico e outros resíduos importantes para atividade catalítica de BACE-1, como Tyr71, demonstraram possuir maior contribuição energética.

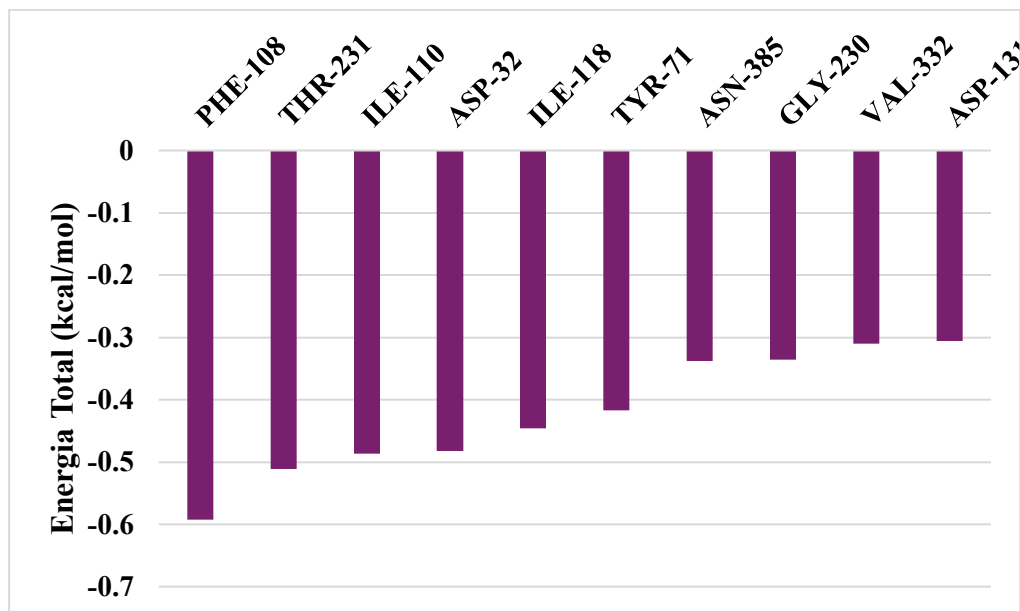


Figura 21. Decomposição por resíduo da energia livre de ligação para o complexo BACE-1-silodosina, calculado usando o método MM/PBSA durante a fase produtiva ($\Delta G < -0,3$ kcal/mol)

Os ensaios *in vitro* e *in silico* realizados com silodosina permitem inferir que o composto pode ser útil no tratamento da DA, e os resultados oriundos dessa pesquisa estão contidos na patente depositada, intitulada “Uso da silodosina para o tratamento da doença de Alzheimer” (Processo BR 10 2024 023762 5, Anexo A). Essas informações foram também utilizadas como ponto de partida para o planejamento de compostos derivados de silodosina, com o objetivo de potencializar a afinidade frente aos alvos e alcançar a inibição tripla.

5.4.1.2 Planejamento dos derivados da silodosina

Ao analisar as informações reunidas desde os mapas de interação oriundos dos ensaios de acoplamento molecular (Barbosa *et al.*, 2023), até as informações extraídas das simulações de DM frente aos três alvos, foi possível identificar os aspectos estruturais da silodosina que podem justificar o comportamento biológico observado nos testes realizados e descritos nas seções anteriores. Esses aspectos foram considerados para a construção da estrutura base (Figura 6B) e as regiões alteradas para as derivações foram destacadas (Figura 22).

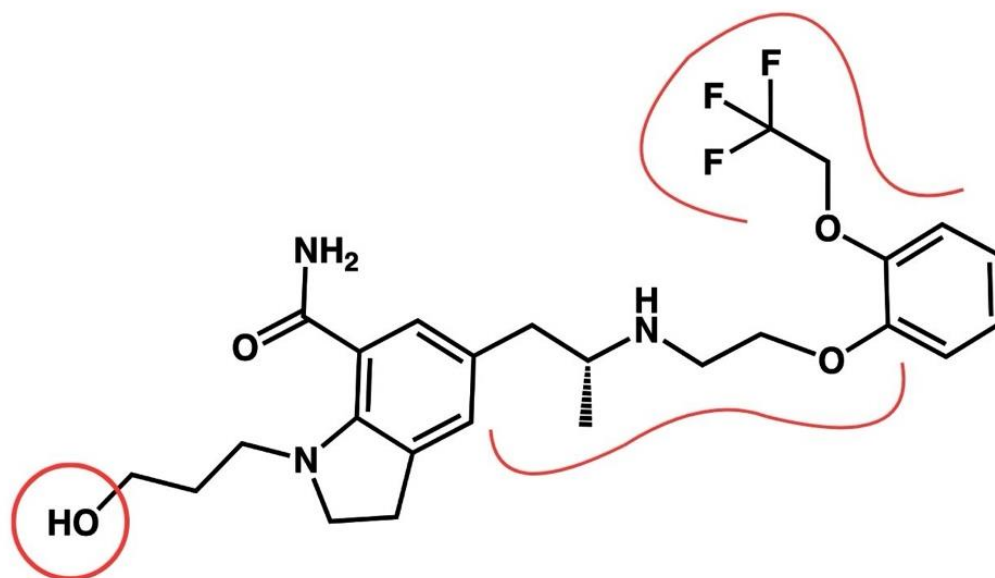


Figura 22. Representação esquemática das regiões que sofreram alterações no planejamento de derivados de silodosina.

Os centros aromáticos contidos na estrutura da silodosina (grupo catecol e indol) foram descritos como envolvidos em interações importantes entre o ligante e o sítio ativo dos três alvos, como interações hidrofóbicas e empilhamento *pi* e, por esse motivo foram mantidos na estrutura de partida para construção dos derivados (Figura 6B). Adicionalmente, a amida e o oxigênio que compõem o grupamento formamida ligado à indolina estão envolvidos em ligações de hidrogênio importantes para a estabilização dos complexos, o que levou a manutenção do grupo na construção dos derivados. A hidroxila terminal do N-propanol ligado à indolina também foi descrita como envolvida em importantes ligações de hidrogênio e, por esse motivo, em alguns derivados foram promovidas trocas bioisostéricas, com o intuito de preservar as interações observadas.

A cadeia responsável por unir os grupamentos catecol e indol, por sua vez, não está diretamente envolvida nas interações intermoleculares descritas. No entanto, essa cadeia é responsável pela flexibilidade da molécula e vem sendo descrita em estudos prévios como sendo importantes para a inibição dos alvos estudados (Honorio *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023), nos quais o tamanho da cadeia pode conferir seletividade entre uma ou outra colinesterase. Assim sendo, foram promovidas variações na cadeia para a construção dos derivados (R2 na Figura 6B/Tabela

1), no que diz respeito a alterações no tamanho e ainda possibilitando a simplificação da estrutura com a retirada do carbono quiral presente na silodosina.

Alterações foram também realizadas na cadeia lateral ao catecol com a substituição do trifluoroetanol por estruturas diversas, onde foram feitas substituições que promovessem variações de volume e polaridade. Tais alterações, juntamente com a simplificação da cadeia que une os grupamentos aromáticos, permitiram avaliar o impacto da liberdade conformacional com o intuito de permitir a melhor acomodação dos ligantes no interior do sítio ativo, já que em AChE a silodosina pareceu acessar apenas o sítio periférico.

Os derivados propostos foram desenhados e submetidos a análises de acoplamento molecular, com o objetivo de avaliar o impacto das alterações na afinidade frente aos alvos.

5.4.1.3 Priorização do derivado da silodosina

Acoplamento molecular é uma estratégia que sugere o modo de ligação responsável pela atividade biológica através da combinação de variáveis como característica estéreas, hidrofóbicas e complementariedade eletrostática, bem como fornecem valores aproximados de energia livre da ligação identificada, como forma de traduzir a afinidade dessa interação (Pagadala; Syed; Tuszynski, 2017; Sethi et al., 2020). Os valores de energia fornecidos pelas simulações de acoplamento molecular para os derivados de silodosina estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Afinidade dos derivados de silodosina frente a AChE, BuChE e BACE-1 em simulações de acoplamento molecular.

	Pontuação AChE (Kcal/mol)	Pontuação BuChE (Kcal/mol)	BACE-1
S01	-9,2	-7,7	37,92
S02	-8,8	-7,5	40,00
S03	-7,9	-8,1	38,56
S04	-7,5	-7,3	39,37
S05	-9,2	-8,1	38,49
S06	-7,9	-8,2	42,44
S07	-8,7	-8,0	43,31
S08	-8,7	-8,2	41,28

S09	-9,7	-7,6	39,68
S10	-9,4	-7,7	38,76
S11	-8,9	-8,2	39,64
S12	-7,6	-7,8	43,48
S13	-9,0	-7,8	39,60
S14	-9,4	-7,8	43,50
S15	-9,4	-8,2	44,00
S16	-8,5	-8,1	41,79
S17	-8,2	-8,5	39,73
S18	-8,5	-8,0	37,36
S19	-8,2	-8,5	38,61
S20	-8,2	-8,5	41,33
S21	-8,1	-8,3	44,60
S22	-9,6	-7,8	38,51
S23	-9,8	-7,7	39,74
S24	-9,4	-7,7	40,09
S25	-9,6	-7,5	39,90
S26	-9,0	-7,6	40,99
S27	-7,9	-7,7	39,86
S28	-9,4	-7,6	40,24
S29	-9,5	-7,5	39,69
S30	-9,4	-7,6	40,21

Os dados obtidos revelaram que derivados com substituintes menores e substituintes mais polares em R₁ (Figura 6B) podem promover melhoria de afinidade frente à AChE, mas reduz afinidade frente à BuChE. Esses resultados podem estar associados à região hidrofóbica de sítio ativo, a qual é composta majoritariamente por resíduos aromáticos em AChE e resíduos com grupamentos alquílicos em BuChE (Figura 2) (Miles; Ross, 2021), o que interfere diretamente na acomodação de ligantes no interior da cavidade e, consequentemente, na seletividade dos alvos. Adicionalmente, foi possível observar que cadeias mais longas em R₂ podem aumentar afinidade frente a AChE mas reduz afinidade frente a BuChE, o que significa que é necessário encontrar um balanço entre os alvos; o grupamento metil ligado ao carbono quiral, por sua vez, não pareceu afetar a afinidade frente as colinesterases.

No que diz respeito a influência das alterações estruturais promovidas sobre a afinidade frente a BACE-1, foi possível observar que substituintes menores em R₁ estão associados à redução da afinidade, similar ao que foi observado frente à BuChE. A polaridade do substituinte nessa posição, por sua vez, parece não exercer nenhum efeito sobre a afinidade frente à BACE-1. No que diz respeito às substituições em R₂, por outro lado, a afinidade frente à BACE-1 parece não ser afetada pelo tamanho da cadeia, mas sofre influência significativa quanto à presença da metila quiral, a qual parece estar envolvida em interações hidrofóbicas em complexos silodosina-BACE-1, conforme observado em estudos prévios de acoplamento molecular (Barbosa *et al.*, 2023). O substituinte em R₃ parece não influenciar a afinidade frente à BACE-1.

A análise dos valores de afinidade obtidos por acoplamento molecular permitiu a seleção do derivado S23 (Figura 23) (Pontuação_{AChE} = -9,8 kcal/mol; Pontuação_{BuChE} = -7,7 kcal/mol; Pontuação_{BACE-1} = 39,74), o qual dentre os derivados apresentou melhor perfil de afinidade frente à AChE. Adicionalmente, os demais valores de afinidade do derivado se encaixam ao ponto de corte adotado em estudos de acoplamento molecular frente a BuChE e BACE-1 realizados previamente (AChE < -7,95 kcal/mol; BuChE < -4,60 kcal/mol; BACE-1 > 37,8) (Barbosa *et al.*, 2023).

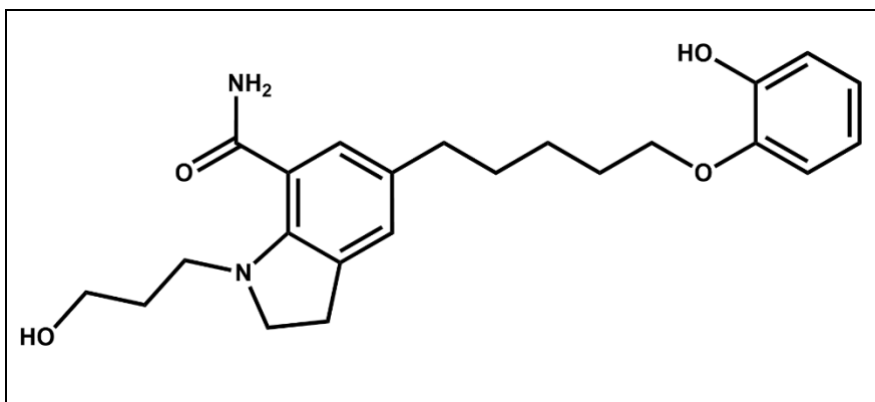


Figura 23. Representação em 2D do derivado S23.

O derivado S23 possui o grupamento indolina ligado ao catecol por cinco átomos de carbono. A indolina contém grupamento formamida ligado ao anel aromático, bem como uma hidroxila a três átomos de carbono do nitrogênio do indol, similar ao observado na estrutura de silodosina. No entanto, apesar da cadeia entre os anéis aromáticos apresentar mesmo número de átomos da cadeia em silodosina, essa cadeia foi simplificada, com a remoção da amina e do carbono

quiral substituído. S23 ainda possui uma hidroxila lateral ao anel aromático, onde na silodosina é composto por trifluoroetanol. No que diz respeito às características físico-químicas, S23 apresenta peso molecular de 398,5 g/mol, $\log P = 3,12$, 3 doadores e 4 aceptores de ligação de hidrogênio, e volume global da molécula de $\sim 171 \text{ \AA}^3$.

Com o objetivo de avaliar o impacto das alterações nas interações intermoleculares estabelecidas frente aos alvos estudados, os mapas de interações oriundos do acoplamento molecular foram analisados (Figura 24, Figura 25 e Figura 26).

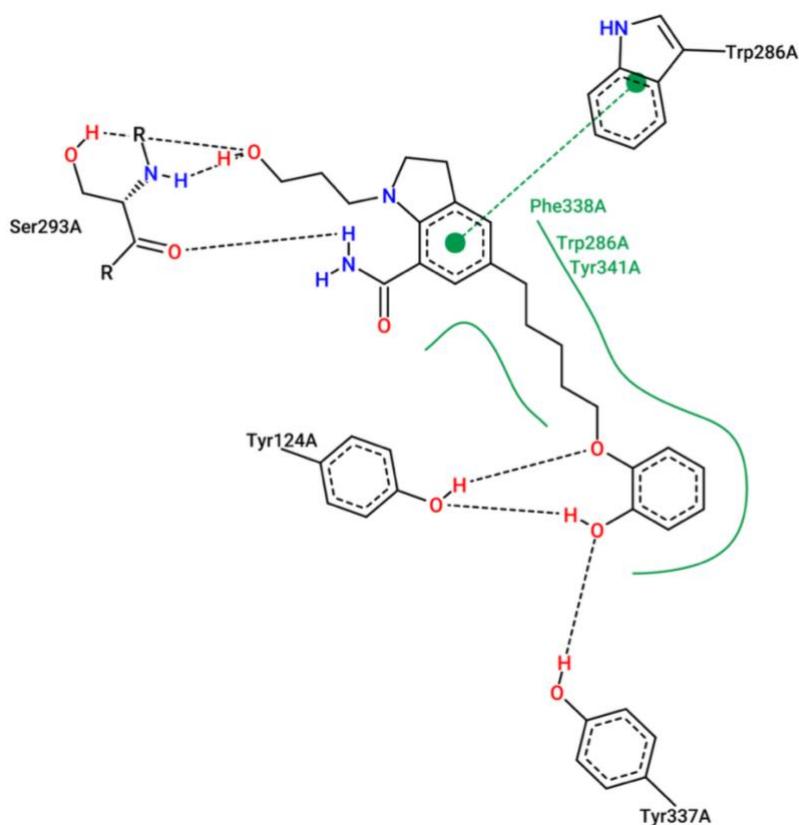


Figura 24. Representação das interações intermoleculares de S23 (Pontuação = -9,8 kcal/mol) no sítio ativo de AChE. Esquema de cores similar à Figura 16.

O mapa de interações do derivado S23 no sítio ativo de AChE demonstra que a indolina pode estabelecer interações do tipo empilhamento *pi* com o indol lateral de Trp286. Essa interação é observada em estudos de acoplamento molecular com a donepezila, um fármaco aprovado pelo FDA para tratamento de indivíduos com DA, bem como é responsável pelo bloqueio do reconhecimento da ACh pela AChE (Makarian *et al.*, 2022). A hidroxila do N-propanol e a amida

do grupo formamida podem realizar ligações de hidrogênio com diferentes átomos presentes em Ser293, e estas interações estão relacionadas ao acréscimo de afinidade e duração do efeito inibitório de ligantes conhecidos, como donepezila (Niu *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a cadeia conectora dos anéis aromáticos de S23 e o grupo catecol do ligante estabelecem interações hidrofóbicas com os resíduos Trp286, Phe338 e Tyr341, bem como ligações de hidrogênio com as hidroxilas laterais de Tyr124 e Tyr337, o que, ao contrário do que foi observado nos mapas de interação de silodosina, revela que o derivado consegue estabelecer interações com ambas as regiões do sítio ativo de AChE – periférico e hidrofóbico. Essas interações sugerem que a simplificação da cadeia conectora e a alteração do substituinte no catecol promovem alterações conformacionais que permitem maior acesso do ligante ao interior do sítio ativo e conferem habilidade de ligar-se a ambas as regiões periférica e hidrofóbica. Esse comportamento indica que S23 tem os requisitos para inibir a atividade catalítica de AChE, uma vez que essas interações promovem a formação de complexos mais estáveis entre inibidores conhecidos de AChE e a enzima (Chen *et al.*, 2017; Makarian *et al.*, 2022; Miles; Ross, 2021).

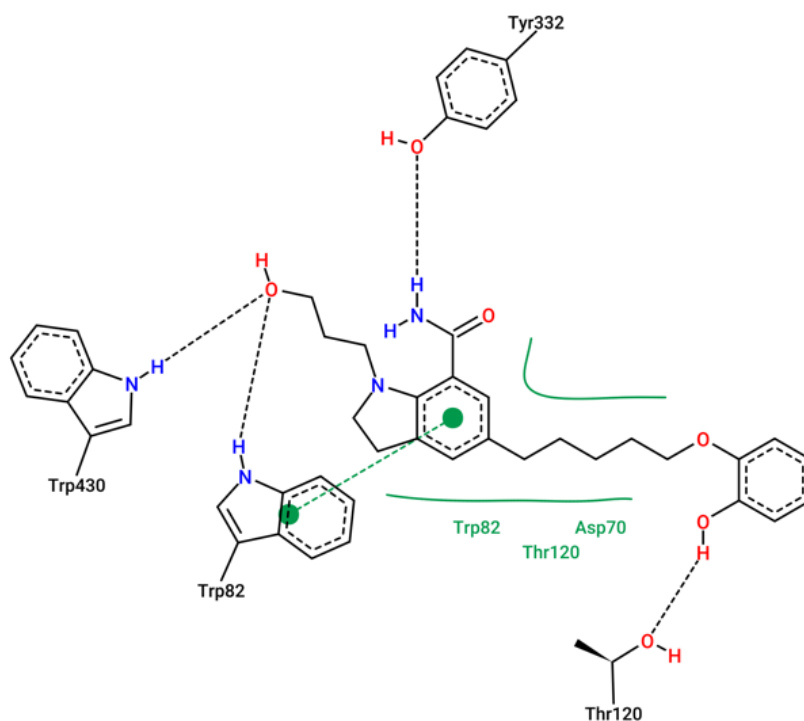


Figura 25. Representação das interações intermoleculares de S23 (Pontuação = -7,7 kcal/mol) no sítio ativo de BuChE. Esquema de cores similar à Figura 16.

Embora S23 tenha apresentado menor pontuação de acoplamento molecular frente a BuChE em comparação ao composto de origem, o mapa de interações demonstra que importantes interações previamente observadas nos ensaios com silodosina são mantidas no composto derivado, como por exemplo interações hidrofóbicas com os resíduos Asp70 e Trp82 (Barbosa *et al.*, 2023). O anel aromático presente na indolina pode estabelecer interações do tipo empilhamento π com o indol lateral de Trp82, o qual está também atua como doador de ligação de hidrogênio com a hidroxila do grupo N-propanol. Essas interações com Asp70 e Trp82 são descritas como responsáveis pela inibição da BuChE em escala do baixo micro molar (Dighe *et al.*, 2016; Miles; Ross, 2021). Adicionalmente, a hidroxila do N-propanol pode atuar como acceptor de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral de Trp430, a hidroxila do catecol pode atuar como doador de ligação de hidrogênio com a hidroxila lateral de Thr120 e a amida da formamida pode estabelecer ligação de hidrogênio como doador com a hidroxila lateral de Tyr332. Uma vez que interações de natureza hidrofóbica e eletrostática foram identificadas como fundamentais para estabilização do complexo para inibição de BuChE (Tabela 2), juntamente com a importância dos resíduos listados envolvidos nas interações, o mapa de interações sugere que S23 é capaz de inibir a atividade catalítica de BuChE.

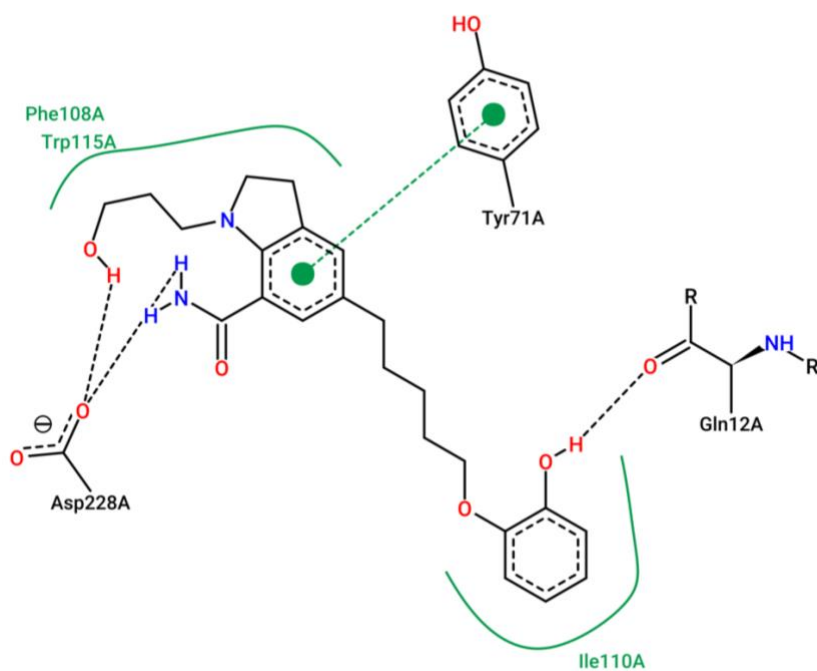


Figura 26. Representação das interações intermoleculares de S23 (Pontuação = 39,74) no sítio ativo de BACE-1. Esquema de cores similar à Figura 16.

Similar ao observado no que diz respeito a afinidade frente a BuChE, a molécula S23 apresenta valor de afinidade inferior frente à BACE-1 quando comparado à silodosina. Entretanto, o mapa de interações obtido (Figura 26) revela que importantes interações intermoleculares podem ser estabelecidas entre o ligante e a BACE-1. A interação de empilhamento *pi* observada na simulação de DM do complexo silodosina-BACE-1 entre o anel aromático da indolina e o anel aromático do resíduo Tyr71 foi mantida, e essa interação é associada ao movimento de abertura e fechamento do sítio ativo da enzima. Interações dessa natureza são descritas como responsáveis por bloquear o acesso do substrato à BACE-1, causando inibição da atividade catalítica.

Adicionalmente, a hidroxila do N-propanol, bem como o grupo indol-7-carboxamida, podem realizar ligações de hidrogênio com o Asp228 catalítico, a qual também foi observada no complexo silodosina-BACE-1 (Figura 15) e tem sido descrita como fundamental para bloqueio da atividade catalítica de BACE-1 (Narang; Goyal; Goyal, 2019). Além destas, a região do grupamento indolina e cadeia N-propanol pode estabelecer interações hidrofóbicas com os resíduos Phe108 e Trp115. Na região do anel catecol, por sua vez, foi observado o estabelecimento de interações hidrofóbicas com Ile110, bem como ligações de hidrogênio entre a hidroxila e a carbonila aceptora de Gln12. Tais interações têm sido observadas em estudos *in silico* com compostos com atividade inibitória frente à BACE-1 (Coimbra *et al.*, 2020; Tran *et al.*, 2020).

A análise *in silico* do derivado S23 sugere que o composto possui requisitos estruturais para inibição tripla frente a AChE, BuChE e BACE-1 além de preservar interações intermoleculares cruciais para atividade, e por esse motivo foi priorizado para as etapas de síntese.

5.4.2 Avaliação dos produtos de síntese do derivado S23

A rota sintética planejada para a obtenção do derivado S23 envolve sete etapas reacionais sequenciais, conforme descrito na seção 4.4.2. Entretanto, o processo de otimização da síntese de INT3 consumiu uma parte significativa do tempo durante o período de doutorado sanduíche no exterior e, por esse motivo, o tempo não foi suficiente para o término da síntese completa de S23. Assim, foram obtidos quatro produtos intermediários (INT1, INT2, INT4, INT5) com rendimento e pureza suficientes para a realização de ensaios biológicos preliminares, com o intuito de validar

as inferências realizadas acerca dos aspectos estruturais e atividade biológica. Tais produtos foram testados frente às colinesterases² e avaliados por simulações de DM.

Tabela 4. Avaliação *in vitro* dos intermediários da síntese de S23

	IC50 AChE (μM)	IC50 BuChE (μM)
INT1	192,70 ± 59,23	74,81 ± 21,51
INT2	288,20 ± 93,29	170,90 ± 21,86
INT4	65,57 ± 9,48	14,94 ± 2,51
INT5	61,74 ± 13,79	54,46 ± 9,63

Os dados de avaliação biológica dos intermediários permitem observar que, à medida que as etapas de síntese avançam ocorre melhora no perfil inibitório frente às colinesterases, especialmente no que diz respeito à AChE. Quando comparados à silodosina ($IC_{50}^{AChE} > 500 \mu M$), os intermediários apresentaram uma redução significativa no valor da concentração inibitória mínima para a AChE (Tabela 4/Apêndice B), especialmente INT4 e INT5, contornando uma das grandes limitações do composto original capaz de inibir apenas a atividade catalítica de BuChE. Esses resultados sugerem que elementos estruturais, como a indolina e o catecol já presentes nesses compostos podem estar diretamente relacionados à atividade observada. Tais intermediários compartilham grupos-chave da estrutura final pretendida, o que reforça a relevância de suas avaliações e justifica investigações adicionais.

Por esse motivo, para confirmar as hipóteses e analisar os eventos do ponto de vista atomístico, o produto de síntese identificado como INT4, devido seu melhor perfil de atividade, foi submetido a simulações de DM, complexado a AChE, BuChE e BACE-1 com o auxílio das métricas de RMSD, RMSF e análise de interações intermoleculares por estrutura representativa (Figuras 27-33).

² A avaliação da viabilidade celular e atividade anti-BACE-1 dos produtos de síntese está sendo realizada por colaboradores e ainda não foi concluída.

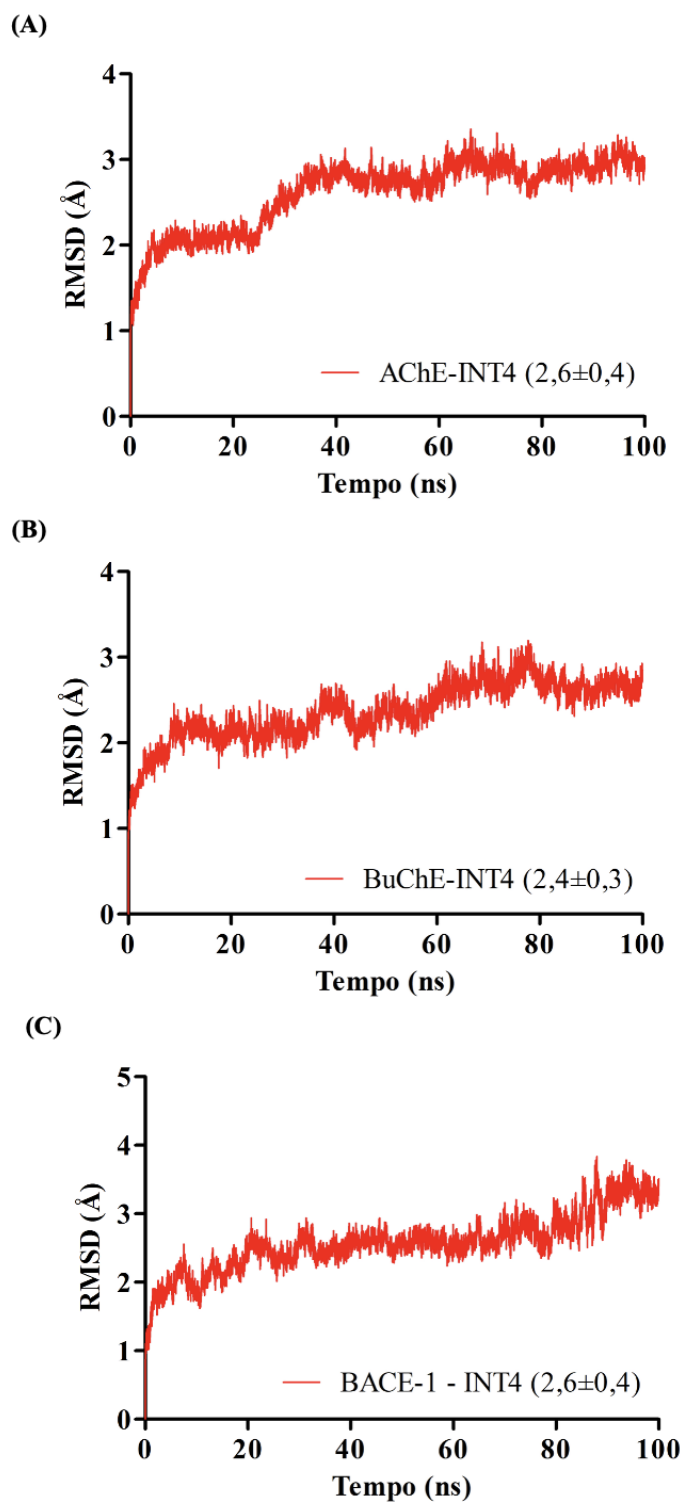


Figura 27. RMSD para a cadeia principal (*backbone*) durante as trajetórias de simulações de DM dos sistemas de (A) AChE, (B) BuChE e (C) BACE-1 complexadas com INT4.

A avaliação dos gráficos de RMSD dos sistemas contendo INT4 permite observar a tendência ao equilíbrio à medida que as simulações avançam em tempo. O valor médio de RMSD para os sistemas sugerem o equilíbrio das simulações, uma vez que todas apresentaram valores inferiores a $3,0\text{\AA}$ (Abouzied *et al.*, 2024).

De forma similar as análises anteriores, informações acerca das flutuações atômicas foram avaliadas individualmente através de dados de RMSF (Figura 28, Figura 29 e Figura 30) e, para tal, foram selecionados intervalos $\Delta t = 40$ ns (AChE = 60 a 100 ns; BuChE = 60 a 100 ns; BACE-1 = 30 a 70 ns) como fase produtiva das simulações.

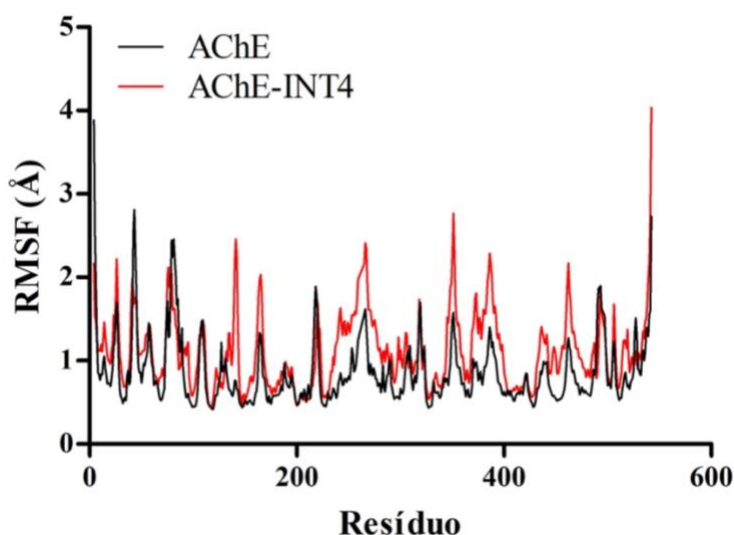


Figura 28. RMSF ($\text{\AA}$) (*backbone*) de AChE nas formas APO e complexada com INT4 durante a fase produtiva ($\Delta t = 40\text{ns}$).

Os dados revelam que a flutuação atômica de INT4 complexado com AChE ($\text{RMSF} = 1,1 \pm 0,4 \text{\AA}$) é estatisticamente similar às flutuações das formas APO ($\text{RMSF} = 0,8 \pm 0,4 \text{\AA}$) e complexada com silodosina ($\text{RMSF} = 0,9 \pm 0,5 \text{\AA}$) (Figura 12), o que sugere que a presença do ligante não promove alterações conformacionais significativas na estrutura de AChE. Portanto, apesar de serem observadas diferenças em algumas regiões da forma APO em relação ao complexo, de um modo geral a presença do composto parece não acarretar maiores perturbações estruturais.

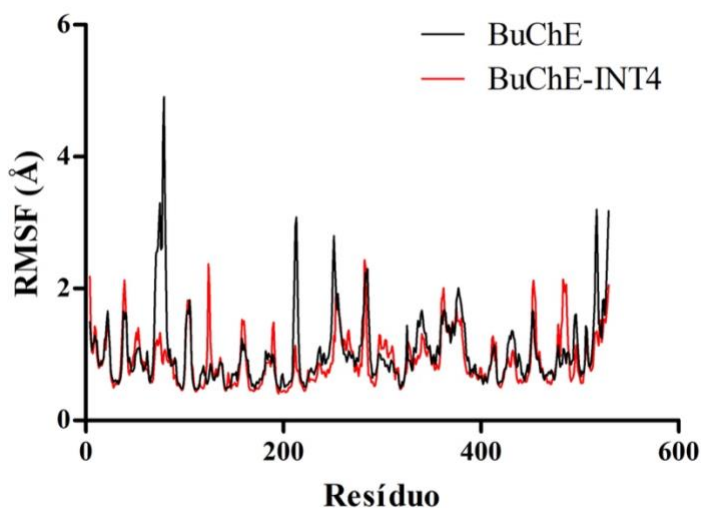


Figura 29. RMSF (Å) (*backbone*) de BuChE nas formas APO e complexada com INT4 durante a fase produtiva ($\Delta t = 40\text{ns}$).

A avaliação de RMSF do sistema de INT4 complexado à BuChE ($\text{RMSF} = 0,9 \pm 0,4$), por sua vez, permite observar que em algumas regiões contendo resíduos que compreendem o sítio ativo há uma maior estabilidade do sistema, sugerindo menor flutuação e alterações conformacionais que podem favorecer a catálise quando na presença do ligante. Esse dado demonstra comportamento de INT4 similar ao observado na simulação contendo silodosina (Figura 13).

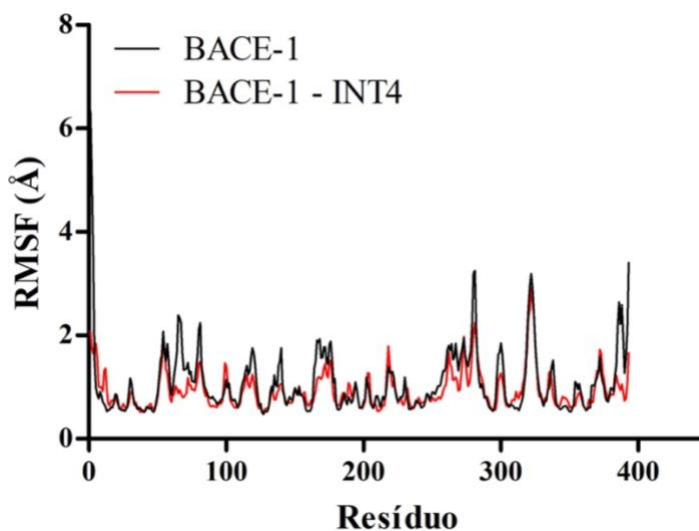


Figura 30. RMSF (Å) (*backbone*) de BACE-1 nas formas APO e complexada com INT4 durante a fase produtiva ($\Delta t = 40\text{ns}$).

A avaliação do RMSF de INT4 complexado em BACE-1 ($\text{RMSF} = 0,9 \pm 0,4 \text{ \AA}$) revela que as flutuações atômicas do complexo são estatisticamente similares à forma APO ($\text{RMSF} = 1,1 \pm 0,4 \text{ \AA}$) (Figura 14). No entanto, é possível observar menores flutuações no sistema complexado, o que sugere que alterações conformacionais importantes para a atividade catalítica de BACE-1 podem não ocorrer na presença de INT4.

Em uma análise preliminar, os dados de RMSD e RMSF corroboram com os dados obtidos nos ensaios *in vitro* frente às colinesterases, e sugerem que INT4 é capaz também de inibir a atividade catalítica de BACE-1. Adicionalmente, com o intuito de caracterizar as interações intermoleculares responsáveis pela estabilidade dos sistemas bem como pela atividade biológica, foram selecionadas estruturas representativas para os sistemas AChE-INT4 (Figura 31), BuChE-INT4 (Figura 32) e BACE-1-INT4 (Figura 33).

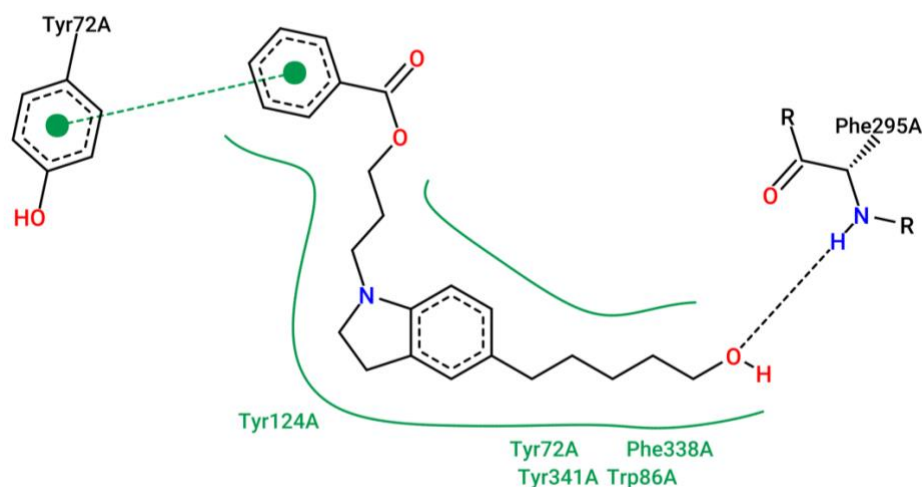


Figura 31. Interações de INT4 no sítio ativo de AChE obtido da estrutura representativa da simulação de DM ($t = 83,9 \text{ ns}$). Esquema de cores similar à Figura 16.

O mapa de interações da estrutura representativa de INT4 complexado com AChE (Figura 31) sugere a ocorrência de interação do tipo empilhamento *pi* entre o anel aromático do grupo protetor com o anel aromático lateral de Tyr72, localizado no sítio periférico. Esse resíduo ainda está envolvido em interações de natureza hidrofóbica, assim como os resíduos Tyr124 e Tyr341, também localizados no sítio periférico, o resíduo Phe338 localizado no sítio aniônico e Trp86, envolvido na ligação da colina e adesão do substrato ao sítio ativo de AChE, estão envolvidos em interações da mesma natureza. Adicionalmente, Phe295 (sítio aniônico) pode atuar como doador

de ligação de hidrogênio com a hidroxila terminal. O estabelecimento de interações com as diversas regiões do sítio ativo de AChE é descrito como importante para a estabilização do complexo ligante-macromolécula (Makarian *et al.*, 2022; Miles; Ross, 2021) que pode levar à atividade inibitória, e isso parece ter sido favorecido através da simplificação da cadeia na construção dos derivados propostos e já observada na estrutura de INT4, majoritariamente hidrofóbica e flexível, e essas interações podem estar relacionadas ao resultado observado nos dados de atividade *in vitro*.

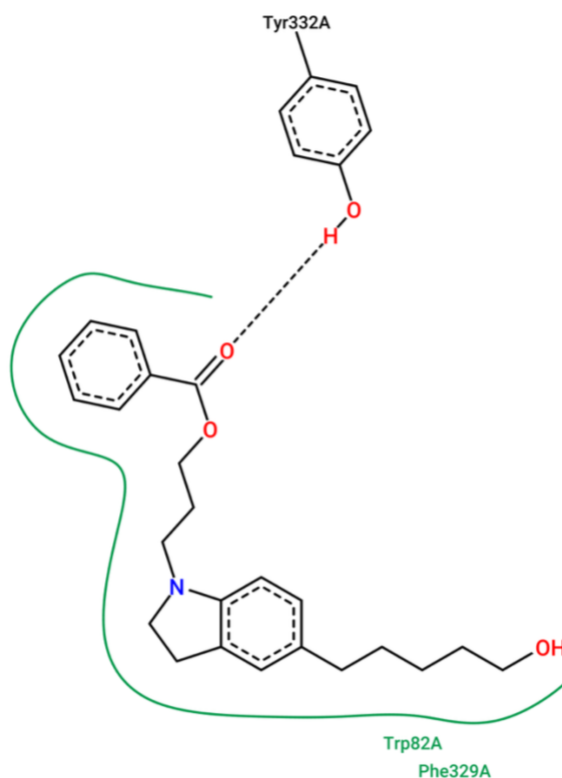


Figura 32. Interações de INT4 no sítio ativo de BuChE obtido da estrutura representativa da simulação de DM ($t = 79,9$ ns). Esquema de cores similar à Figura 16.

O mapa de interações da estrutura representativa de INT4 complexado ao sítio ativo de BuChE (Figura 32), ilustra que o produto é capaz de estabelecer interações hidrofóbicas em toda a sua extensão com resíduos fundamentais para atividade catalítica de BuChE, como Trp82 e Phe329. Adicionalmente, o oxigênio da carbonila do grupo protetor atua como aceptor de ligação de hidrogênio com a hidroxila lateral de Tyr332. Diferenças discretas quanto ao perfil de interação do INT4 quando comparado a silodosina pode sustentar pequenas variações da atividade biológica

($IC_{50}^{\text{Silodosina}} = 3,02 \mu\text{M}$ vs $IC_{50}^{\text{INT4}} = 14,94 \mu\text{M}$), entretanto o fenômeno biológico envolve outros aspectos que o estado da arte atual não permite identificar.

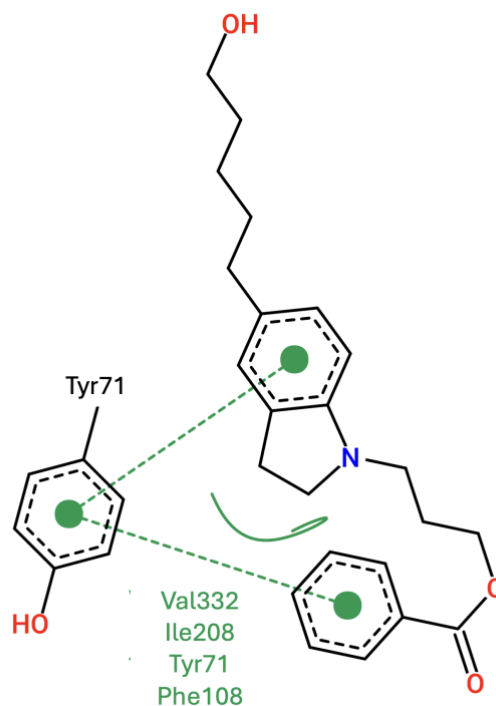


Figura 33. Interações de INT4 no sítio ativo de BACE-1 obtido da estrutura representativa da simulação de DM ($t = 51,9 \text{ ns}$). Esquema de cores similar à Figura 16.

O mapa de interações da estrutura representativa de INT4 complexado com BACE-1 (Figura 33) ilustra a possível ocorrência de interações do tipo empilhamento *pi* entre os anéis aromáticos da indolina e do grupo protetor com o anel da cadeia lateral de Tyr71, resíduo fundamental para a alteração conformacional necessária para catálise realizada por BACE-1. Complementarmente, Tyr71 e outros resíduos como Val332, Ile208 e Phe108 estão envolvidos em interações hidrofóbicas com a região da indolina do ligante, o que sugere que INT4 possui potencial para inibir atividade de BACE-1.

Coletivamente, os dados observados a partir das estratégias aplicadas nesse estudo corroboram com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, bem como salientam a importância das ferramentas computacionais para guiar a síntese e seleção de candidatos a fármacos mais potentes. Por esse motivo, o composto INT4 reúne os requisitos estruturais e físico-químicos para ser um candidato a fármaco anti-Alzheimer e/ou ponto de partida para novas derivações, incluindo as já

estabelecidas nesse trabalho (seção 4.4.1.2). Assim, na tentativa de contribuir com novos estudos que possam maximizar as chances de obtenção de novos candidatos a multialvos promissores com atividade anti-Alzheimer, um compilado de informações-chave foram extraídas desse estudo (Figura 34), a saber:

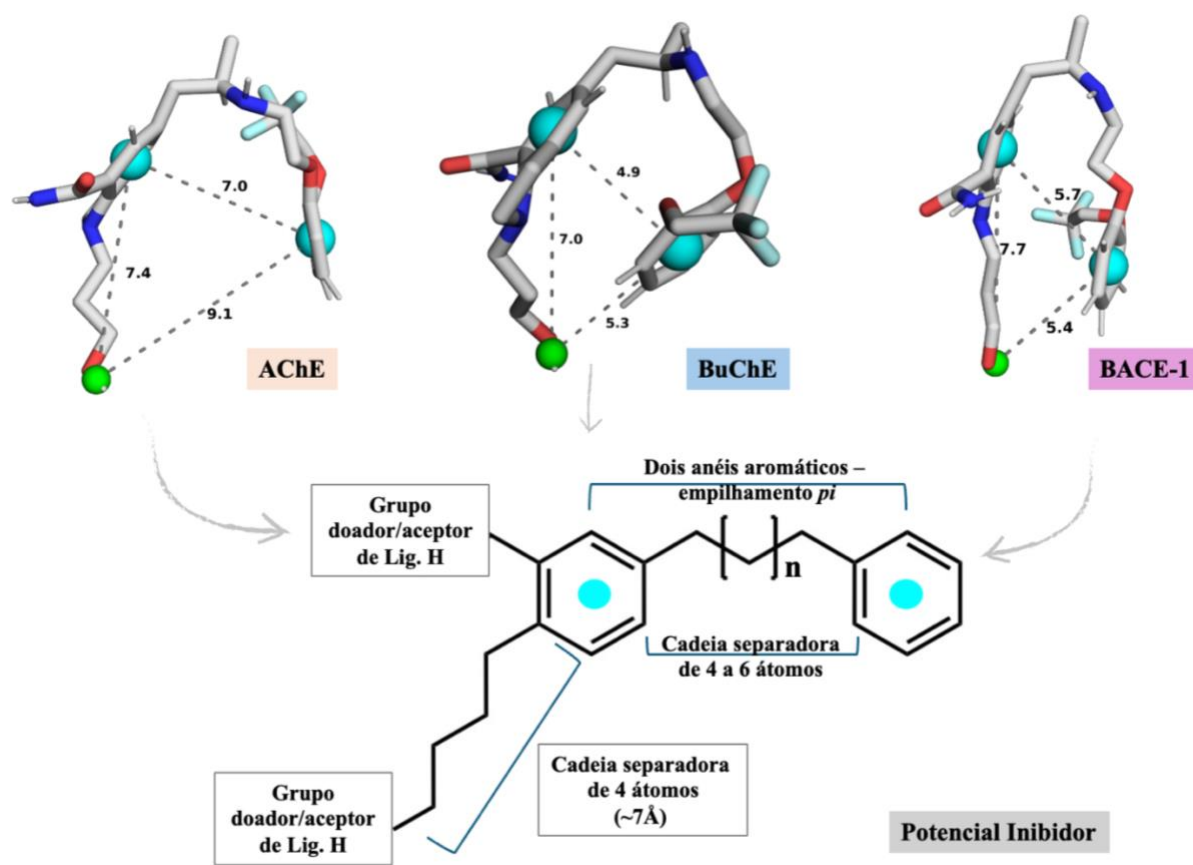


Figura 34. Representação esquemática de requisitos estruturais para inibição simultânea de AChE, BuChE e BACE-1. Acima, conformação representativa adotada por silodosina nos respectivos sítios de ligação. Bastões em cinza = carbono; azul escuro = nitrogênio; vermelho = oxigênio; ciano = flúor; esferas ciano = centros aromáticos; esferas verdes = grupo doador/aceptor de ligação de hidrogênio.

Com o objetivo de promover inibição tripla, as avaliações demonstraram a importância de estruturas aromáticas, as quais estiveram envolvidas em interações com resíduos fundamentais para inibição dos três alvos, unidas por uma cadeia flexível, variando entre quatro e seis átomos, a qual pode ou não ser alifática ou apresentar substituintes, desde que preserve a flexibilidade do composto. A flexibilidade se faz importante, juntamente com substituintes pouco volumosos (ou ausência de substituição em um dos anéis), devido à necessidade de assumir conformações que permitam a entrada e acomodação do ligante no sítio ativo de AChE, de modo a garantir interações

com resíduos localizados no sítio periférico, mas também no interior do sítio ativo, como Ser293 e Tyr341. Essa liberdade conformacional também pode favorecer interações com resíduos presentes no sítio periférico de BuChE responsáveis pela manutenção da estrutura e inibição da entrada do substrato ao sítio ativo, como Asp70 e Trp82, e com o Asp32 catalítico em BACE-1. A presença de um grupo aceptor ou doador de ligação de hidrogênio terminal a quatro carbonos de um dos anéis aromáticos ($\sim 7\text{\AA}$), bem como em posição *orto* no mesmo anel mostrou ser fundamental, uma vez que estão envolvidos em importantes interações nos três alvos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O reposicionamento de fármacos consiste em uma estratégia amplamente utilizada pela indústria farmacêutica como uma alternativa para otimizar o processo de identificação de novos tratamentos, em especial para doenças complexas com perfil multifatorial. Nesses casos, fármacos previamente aprovados por órgãos regulatórios são reposicionados para novas indicações, e essa estratégia tem se beneficiado de técnicas computacionais para identificação dos novos alvos terapêuticos e para planejamento racional de novas entidades. Dessa forma, através de triagem virtual por modelo farmacofórico e acoplamento molecular, estudos anteriores identificaram a silodosina como um potencial inibidor triplo de AChE, BuChE e BACE-1 para tratamento da doença de Alzheimer.

De posse dessa informação, a silodosina foi submetida a ensaios de viabilidade celular e avaliação biológica frente aos três alvos, dos quais foi possível identificar atividade biológica em escala do baixo micromolar frente a BuChE e BACE-1. No entanto, a inibição da atividade catalítica da AChE não foi satisfatória. Por esse motivo, com o objetivo de identificar os aspectos moleculares envolvidos nos resultados *in vitro* obtidos, foram realizadas simulações de dinâmica molecular da silodosina complexada a AChE, BuChE e BACE-1.

Os dados obtidos a partir das simulações de DM, juntamente com os dados de atividade biológica serviram como base para o planejamento de derivados da silodosina, com o objetivo de propor melhorias na estrutura da molécula e identificar um composto com atividade biológica frente aos três alvos. Foram propostos 30 derivados, os quais foram submetidos a ensaios de acoplamento molecular para priorização do composto com potencial atividade de inibição tripla. O composto priorizado teve sua rota de síntese planejada, em um processo previsto para ocorrer em sete etapas, realizado durante o período de doutorado sanduíche no exterior, em uma parceria com a University of the Incarnate Word, localizada no Texas/USA.

No entanto, devido a limitações de tempo, durante o período de doutorado sanduíche no exterior não foi possível realizar todas as etapas de síntese. Foram obtidos quatro produtos intermediários de síntese com rendimento e pureza suficientes para a realização de ensaios biológicos preliminares. Dentre os compostos testados, os produtos identificados como INT4 e INT5 apresentaram resultados biológicos promissores em ensaios *in vitro*, sugerindo que as

modificações propostas estão realmente envolvidas no mecanismo de ação do inibidor, e esses resultados foram corroborados pelas simulações de DM realizadas com o INT4.

Desse modo, os dados obtidos confirmam a importância do uso de ferramentas *in silico* e *in vivo* para guiar o planejamento racional de novos compostos com potencial atividade multialvo. Além disso, a avaliação dos produtos intermediários da síntese do derivado da silodosina permitiram validar a estratégia sintética proposta, além de fornecer subsídios importantes para ajustes futuros nas condições reacionais. A continuidade da síntese e avaliação do produto consiste em uma promissora abordagem para a realização de estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ABOUZIED, A. S. *et al.* Structural and free energy landscape analysis for the discovery of antiviral compounds targeting the cap-binding domain of influenza polymerase PB2. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2024.
- ABRAHAM, M. J. *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [s. l.], v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- ABUBAKAR, D.; UMAR, A. M. Characterization of Acetylcholinesterase from various sources: a mini review. **Journal of Environmental Bioremediation & Toxicology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 24–30, 2021.
- ADALAT, B. *et al.* Biologically Potent Benzimidazole-Based-Substituted Benzaldehyde Derivatives as Potent Inhibitors for Alzheimer's Disease along with Molecular Docking Study. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 16, n. 2, 2023.
- AFGHAH, Z. *et al.* Involvement of Endolysosomes and Aurora Kinase A in the Regulation of Amyloid β Protein Levels in Neurons. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 11, 2024.
- AL-JOUFI, F. A. *et al.* Flavonoid Derivatives as Potential Cholinesterase Inhibitors in Scopolamine-Induced Amnesic Mice: An *In Vitro*, *In Vivo* and Integrated Computational Approach. **Brain Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 6, 2022.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **2023 Alzheimer's disease facts and figures**. [S. l.]: Alzheimer's Dement, 2023.
- ANDREEVA, A. *et al.* The SCOP database in 2020: Expanded classification of representative family and superfamily domains of known protein structures. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 48, 2020.
- ARSHAVSKY, Y. I. Alzheimer's Disease: From Amyloid to Autoimmune Hypothesis. **The Neuroscientist**, [s. l.], v. 26, n. 5–6, p. 455–470, 2020.
- BARBOSA, D.B. *et al.* Development of Potential Multi-Target Inhibitors for Human Cholinesterases and Beta-Secretase 1: A Computational Approach. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 16, n. 12, 2023.
- BEKDASH, R. A. The cholinergic system, the adrenergic system and the neuropathology of Alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], 2021.
- BERENDSEN, H. J.C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **Journal of Physical Chemistry**, [s. l.], v. 91, n. 24, p. 6269–6271, 1987.

BIOGEN. **Biogen to realign resources for Alzheimer's disease franchise.** [S. l.], 2024. Disponível em: <https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/biogen-realign-resources-alzheimers-disease-franchise>. Acesso em: 30 jan. 2024.

BOWMAN, G. R. Accurately modeling nanosecond protein dynamics requires at least microseconds of simulation. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 558–566, 2016.

BRASIL *et al.* **Relatório Nacional sobre a Demência: Epidemiologia, (re)conhecimento e projeções futuras.** Brasília: [s. n.], 2024. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/>. .

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANTÁRIA. **Kisunla (donanemabe): novo registro.** [S. l.], 2025.

BRINGAS, Santos *et al.* Alzheimer's Disease stage identification using deep learning models. **Journal of Biomedical Informatics**, [s. l.], v. 109, 2020.

BUCKINGHAM, A. D.; DEL BENE, J. E.; MCDOWELL, S. A.C. The hydrogen bond. **Chemical Physics Letters**, [s. l.], v. 463, n. 1–3, p. 1–10, 2008.

CAI, W. *et al.* Physiological Roles of β -amyloid in Regulating Synaptic Function: Implications for AD Pathophysiology. **Neuroscience Bulletin**, [s. l.], 2023.

CALLIGARO, D. O. Use of *in vitro* models in drug development and issue resolution. In: **Advanced issue resolution in safety pharmacology.** Indianapolis: Elsevier, 2018. p. 287–302.

CAVDAR, H. *et al.* Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with uracil derivatives: kinetic and computational studies. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 429–437, 2019.

CERVELLATI, C. *et al.* Serum beta-secretase 1 (BACE1) activity as candidate biomarker for late-onset Alzheimer's disease. **GeroScience**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 159–167, 2020.

CHANDRA, S.; SISODIA, S. S.; VASSAR, R. J. The gut microbiome in Alzheimer's disease: what we know and what remains to be explored. **Molecular Neurodegeneration**, [s. l.], 2023.

CHAUDHARY, A. *et al.* Current Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. **Journal of Biomedicine**, [s. l.], v. 3, p. 74–84, 2018.

CHEN, Y. *et al.* Discovery of new acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors through structure-based virtual screening. **RSC Advances**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 3429–3438, 2017.

CHEN, Y. G. Research Progress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Chinese Medical Journal**, [s. l.], v. 131, n. 13, p. 1618–1624, 2018.

CHEN, Z. R. *et al.* Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. **Molecules**, [s. l.], 2022.

CHEUNG, J. *et al.* Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone i and territrem B show peripheral site flexibility. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 1091–1096, 2013.

CHOUDHURY, C.; SASTRY, G. N. Pharmacophore modeling and screening: concepts, recent developments and applications in rational drug design. *In*: MOHAN, C. (org.). **Structural Bioinformatics: applications in preclinical drug discovery process**. [S. l.]: Springer Cham, 2019. v. 27.

CHUA, P. F.; LIM, W. K. Optimization of a PC12 cell-based *in vitro* stroke model for screening neuroprotective agents. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021.

COIMBRA, J. R.M. *et al.* Combining virtual screening protocol and *in vitro* evaluation towards the discovery of BACE1 inhibitors. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 4, 2020.

COLE, S. L.; VASSAR, R. The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. **Molecular Neurodegeneration**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2007.

COLOVIC, M. B. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

CONTI FILHO, C. E. *et al.* Advances in Alzheimer's disease's pharmacological treatment. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], 2023.

DANDEKAR, B. R.; SINHA, S.; MONDAL, J.. Role of molecular dynamics in optimizing ligand discovery: Case study with novel inhibitor search for peptidyl t-RNA hydrolase. **Chemical Physics Impact**, [s. l.], v. 3, 2021.

DANIŞMAN, B. *et al.* The Role of Acetylcholine on the Effects of Different Doses of Sulfite in Learning and Memory. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 47, n. 11, p. 3331–3343, 2022.

DANTAS, J. M. *et al.* Efficacy of anti-amyloid- β monoclonal antibody therapy in early Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Neurological Sciences**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 2461–2469, 2024.

DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 131–138, 2003.

DE CAVALCANTE, S. F. *et al.* Straightforward, economical procedures for microscale ellman's test for cholinesterase inhibition and reactivation. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 41, n. 10, p. 1192–1195, 2018.

DE ALMEIDA, R.B.M. *et al.* Identification of a Novel Dual Inhibitor of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase: *In Vitro* and *In Silico* Studies. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2023.

- DE ALMEIDA, R. B. M. *et al.* *Ocotea daphnifolia*: Phytochemical investigation, *in vitro* dual cholinesterase inhibition, and molecular docking studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 57, 2021.
- DE BOER, D. *et al.* A comprehensive review of cholinesterase modeling and simulation. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2021.
- DIGHE, S. N. *et al.* Discovery and structure-activity relationships of a highly selective butyrylcholinesterase inhibitor by Structure-based virtual screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 16, p. 7683–7689, 2016.
- DO BOMFIM, M. R. *et al.* Identification of potential human beta-secretase 1 inhibitors by hierarchical virtual screening and molecular dynamics. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], 2022.
- DOGGRELL, S. A. Lessons that can be learnt from the failure of Verubecestat in Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 20, n. 17, p. 2095–2099, 2019.
- DOMÍNGUEZ, J. L. *et al.* Effect of the protonation state of the titratable residues on the inhibitor affinity to BACE-1. **Biochemistry**, [s. l.], v. 49, n. 34, p. 7255–7263, 2010.
- DOTOLO, S. *et al.* A review on drug repurposing applicable to COVID-19. **Briefings in Bioinformatics**, [s. l.], 2021.
- EGAN, M. F. *et al.* Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 380, n. 15, p. 1408–1420, 2019.
- EISENMENGER, L. B. *et al.* Vascular contributions to Alzheimer's disease. **Translational Research**, [s. l.], v. 254, p. 41–53, 2023.
- EL-HUSSIENY, M. *et al.* Synthesis, biological evaluation, and molecular dynamics of novel coumarin based phosphorothioates as cholinesterase inhibitors. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1272, 2023.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.
- ELMALEH, D. R. *et al.* Developing Effective Alzheimer's Disease Therapies: Clinical Experience and Future Directions. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 715–732, 2019.
- ERCETIN, T. *et al.* The effects of some organic solvents on the modified Ellman procedure for the assay of cholinesterases. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], 2020.
- FANG, L. *et al.* Active Site Gating and Substrate Specificity of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, [s. l.], v. 115, n. 27, p. 8797–8805, 2011.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. *et al.* Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 101–115, 2016.

FONTANA, I. C.; KUMAR, A.; NORDBERG, A. The role of astrocytic $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer disease. **Nature Research**, [s. l.], 2023.

FRISONI, G. B. *et al.* The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. **Nature Research**, [s. l.], 2022.

FUJIMOTO, K. *et al.* Structure-Based Approaches to Improving Selectivity through Utilizing Explicit Water Molecules: Discovery of Selective β -Secretase (BACE1) Inhibitors over BACE2. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 3075–3085, 2021.

GARBUZ, D. G.; ZATSEPINA, O. G.; EVGEN'EV, M. B. Beta Amyloid, Tau Protein, and Neuroinflammation: An Attempt to Integrate Different Hypotheses of Alzheimer's Disease Pathogenesis. **Molecular Biology**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 670–682, 2021.

GEULA, C.; DARVESH, S. Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer's disease. **Drugs of Today**, [s. l.], v. 40, 2004.

GONG, C. X.; LIU, F.; IQBAL, K. Multifactorial Hypothesis and Multi-Targets for Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 64, n. s1, p. S107–S117, 2018.

GOWERS, R. J. *et al.* MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. 2016.

GUO, Y. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase dual-target inhibitors against Alzheimer's diseases. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 3, 2020.

GUTIÉRREZ, L. J. *et al.* New substituted aminopyrimidine derivatives as BACE1 inhibitors: *in silico* design, synthesis and biological assays. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 229–246, 2019.

HAAM, J.; YAKEL, J. L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 142, n. 10, p. 111–121, 2017.

HAMED, M. Y. Prediction of drug potencies of BACE1 inhibitors: A molecular dynamics simulation and MM_GB(PB)SA scoring. **Computation**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1–24, 2020.

HAMPEL, H. *et al.* Biological markers of amyloid β -related mechanisms in Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 223, n. 2, p. 334–346, 2010.

HAMPEL, H. *et al.* The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 89, n. 8, p. 745–756, 2021.

HANSEL, T. T. *et al.* The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], 2010.

HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; VAN GUNSTEREN, W. F. Molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 190–196, 2002.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's Disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, [s. l.], v. 256, 1992.

HONORIO, P. *et al.* Binding interaction of protoberberine alkaloids against acetylcholinesterase (AChE) using molecular dynamics simulations and QM/MM calculations. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 344, 2021.

HU, X. *et al.* BACE1 deletion in the adult mouse reverses preformed amyloid deposition and improves cognitive functions. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 215, n. 3, p. 927–940, 2018.

HUANG, L. *et al.* Protocatechuic acid attenuates β -secretase activity and okadaic acid-induced autophagy via the Akt/GSK-3 β /MEF2D pathway in PC12 cells. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 1328–1335, 2020.

INCAVIGLIA, I. *et al.* An Approach for the Real-Time Quantification of Cytosolic Protein-Protein Interactions in Living Cells. **ACS Sensors**, [s. l.], v. 6, n. 4, 2021.

JAIN, R.; RAO, J.; RAO, S. **Novel process for the synthesis of indoline derivatives**. 2012/131710. Concessão: 2012.

JEREMIC, D.; JIMÉNEZ-DÍAZ, L.; NAVARRO-LÓPEZ, J. D. Targeting epigenetics: A novel promise for Alzheimer's disease treatment. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], 2023.

JINDAN, L.; XIAO, W.; LIPING, X. Evolving Role of Silodosin for the Treatment of Urological Disorders – A Narrative Review. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], 2022.

JONCZYK, J. *et al.* Dual action of dipyridthiazine and quinobenzothiazine derivatives- anticancer and cholinesterase-inhibiting activity. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 11, 2020.

KAMILOGLU, S. *et al.* Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 332–349, 2020.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature**, [s. l.], v. 9, n. 9, 2002.

KARRAN, E.; DE STROOPER, B. The amyloid hypothesis in Alzheimer disease: new insights from new therapeutics. **Nature Research**, [s. l.], 2022.

KASHYAP, P. *et al.* Ajmalicine and reserpine: Indole alkaloids as multi-target directed ligands towards factors implicated in Alzheimer's disease. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 7, 2020.

KULKARNI, V. S. *et al.* Drug Repurposing: An Effective Tool in Modern Drug Discovery. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 157–166, 2023.

KUMAR, V.; SAHA, A.; ROY, K. Multi-target QSAR modeling for the identification of novel inhibitors against Alzheimer's disease. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s. l.], v. 233, p. 104734, 2023.

KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. G-mmpbsa - A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 1951–1962, 2014.

KURKINEN, M. *et al.* The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: Should We Change Our Thinking? **Biomolecules**, [s. l.], 2023.

KURUVA, C. S.; REDDY, P. H. Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 223–233, 2017.

LANE, R. M.; POTKIN, S. G.; ENZ, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 101–124, 2006.

LEE, H. W. *et al.* Overexpression of BACE1 stimulates spontaneous basal secretion in PC12 cells. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 421, n. 2, p. 178–183, 2007.

LI, H. H. *et al.* Fluorosulfate-containing pyrazole heterocycles as selective BuChE inhibitors: structure-activity relationship and biological evaluation for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 2099–2111, 2022.

LI, X. *et al.* Rational Multitargeted Drug Design Strategy from the Perspective of a Medicinal Chemist. **American Chemical Society**, [s. l.], 2021.

LIANG, Y.; XIE, Y. X.; LI, J. H. Modified palladium-catalyzed Sonogashira cross-coupling reactions under copper-, amine-, and solvent-free conditions. **Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 379–381, 2006.

LIU, Yi *et al.* Biological evaluation, molecular modeling and dynamics simulation of phenanthrenes isolated from *Bletilla striata* as butyrylcholinesterase inhibitors. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–11, 2022.

LIU, P. *et al.* Dual functional antioxidant and butyrylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis and evaluation of novel melatonin-alkylbenzylamine hybrids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 78, 2023.

LIU, D. M.; XU, B.; DONG, C. Recent advances in colorimetric strategies for acetylcholinesterase assay and their applications. **Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], 2021.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAGINN, E. J.; ELLIOTT, J. R. Historical perspective and current outlook for molecular dynamics as a chemical engineering tool. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 3059–3078, 2010.

MAKARIAN, M. *et al.* Synthesis, kinetic evaluation and molecular docking studies of donepezil-based acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1247, 2022.

MANCINI, F. *et al.* Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 388, n. 5–6, p. 1175–1183, 2007.

MANCINI, F.; DE SIMONE, A.; ANDRISANO, V. Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: An overview of in vitro methods for characterization of inhibitors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 400, n. 7, p. 1979–1996, 2011.

MASCARENHAS, A. M. S. *et al.* Pharmacophore-based virtual screening and molecular docking to identify promising dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], 2020.

MERMELSTEIN, D. J.; MCCAMMON, J. A.; WALKER, R. C. pH-dependent conformational dynamics of beta-secretase 1: A molecular dynamics study. **Journal of Molecular Recognition**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 1–8, 2019.

MILES, J. A.; ROSS, B. P. Recent Advances in Virtual Screening for Cholinesterase Inhibitors. **ACS Chemical Neuroscience**, [s. l.], 2021.

MOHR, J. T.; KROUT, M. R.; STOLTZ, B. M. Preparation of (s)-2-allyl-2-methylcyclohexanone. **Organic Syntheses**, [s. l.], v. 86, p. 194, 2009.

MORPHY, R.; KAY, C.; RANKOVIC, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 9, n. 15, p. 641–651, 2004.

MOSTAFA, M.; DISOUKY, A.; LAZAROV, O. Therapeutic modulation of neurogenesis to improve hippocampal plasticity and cognition in aging and Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, [s. l.], 2025.

MUBONANYIKUZO, V. *et al.* Detection of Alzheimer Disease in Neuroimages Using Vision Transformers: Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Medical Internet Research**, [s. l.], v. 27, 2025.

MUSHTAQ, G. *et al.* Status of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1432–1439, 2014.

- NACHON, F. *et al.* Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: Elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyrylcholinesterase. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 453, n. 3, p. 393–399, 2013.
- NARANG, S. S.; GOYAL, D.; GOYAL, B. Molecular insights into the inhibitory mechanism of bi-functional bis-tryptoline triazole against β -secretase (BACE1) enzyme. **Amino Acids**, [s. l.], v. 51, n. 10–12, p. 1593–1607, 2019.
- NASB, M.; TAO, W.; CHEN, N. Alzheimer's Disease Puzzle: Delving into Pathogenesis Hypotheses. **Aging and Disease**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2023.
- NHAN, H. S.; CHIANG, K.; KOO, E. H. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 129, n. 1, p. 1–19, 2015.
- NICOLET, Y. *et al.* Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 42, p. 41141–41147, 2003.
- NIU, C. *et al.* Dynamic mechanism of E2020 binding to acetylcholinesterase: A steered molecular dynamics simulation. **Journal of Physical Chemistry B**, [s. l.], 2005.
- OH, Y. *et al.* SPIN90 Deficiency Ameliorates Amyloid β Accumulation by Regulating APP Trafficking in AD Model Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 18, 2022.
- OLIVEIRA, L. M.; *et al.* Pharmacophore modeling, docking and molecular dynamics to identify Leishmania major farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors. **Journal of Molecular Modeling**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 2554–2568, 2018.
- ONDER, S.; BIBEROGLU, K.; TACAL, O. The kinetics of inhibition of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by methylene violet 3RAX. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 314, p. 108845, 2019.
- OZTEN, O. *et al.* Synthesis, molecular docking and molecular dynamics studies of novel tacrine-carbamate derivatives as potent cholinesterase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 115, 2021.
- PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.
- PAGGI, J. M.; PANDIT, A.; DROR, R. O. The Art and Science of Molecular Docking. **Annual Review of Biochemistry** Downloaded from www.annualreviews.org. Guest, [s. l.], 2024.

PANEK, D. *et al.* Discovery of new, highly potent and selective inhibitors of BuChE - design, synthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation and crystallography studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 249, p. 115135, 2023.

PARK, J. *et al.* Repeated sleep deprivation decreases the flux into hexosamine biosynthetic pathway/O-GlcNAc cycling and aggravates Alzheimer's disease neuropathology in adult zebrafish. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2023.

PARVATHANENI, V. *et al.* Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, [s. l.], 2019.

PASCHALIDIS, M. *et al.* Tendência de mortalidade por doença de Alzheimer no Brasil, 2000 a 2019. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 32, n. 2, 2023.

PASCOINI, A. L. *et al.* *In silico* development of new acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 1007–1021, 2019.

PAUL, T. J. *et al.* Mechanisms of peptide hydrolysis by aspartyl and metalloproteases. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s. l.], v. 18, n. 36, p. 24790–24801, 2016.

PAZ, O. S. *et al.* Modeling of BACE-1 inhibitors as anti-Alzheimer's agents. *In*: NEUROMETHODS. [S. l.]: Humana Press Inc., 2018. v. 132, p. 177–206.

PEDERSEN, W. A.; KLOCZEWIAK, M. A.; BLUSZTAJN, J. K. Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of basal forebrain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 15, 1996.

POHANKA, M.; HRABINOVA, M.; KUCA, K. Diagnosis of intoxication by the organophosphate VX: Comparison between an electrochemical sensor and Ellman's photometric method. **Sensors**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 5229–5237, 2008.

POLISHCHUK, P. *et al.* Virtual screening using pharmacophore models retrieved from molecular dynamic simulations. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 23, 2019.

PORCARI, V. *et al.* A continuous time-resolved fluorescence assay for identification of BACE1 inhibitors. **Assay and Drug Development Technologies**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 287–297, 2005.

QING, X. *et al.* Pharmacophore modeling: Advances, Limitations, And current utility in drug discovery. **Journal of Receptor, Ligand and Channel Research**, [s. l.], v. 7, p. 81–92, 2014.

RADIO, N. M. *et al.* Assessment of chemical effects on neurite outgrowth in PC12 cells using high content screening. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 106–118, 2008.

RAHMAN, A. *et al.* Aducanumab for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review. **Psychogeriatrics**, [s. l.], 2023.

RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. **Acta Biologica Hungarica**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 183–189, 2003.

RAVAL, K.; GANATRA, T. Basics, types and applications of molecular docking: A review. **IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12–16, 2022.

RIZZUTI, B.; GRANDE, F. Virtual screening in drug discovery: a precious tool for a still-demanding challenge. In: PEY, A. L. (org.). **Protein Homeostasis Diseases: Mechanisms and Novel Therapies**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2020. p. 309–327.

RODRIGUES, S. R. *et al.* Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 181–188, 2011.

ROMBOUTS, F. *et al.* Small-molecule BACE1 inhibitors: a patent literature review (2011 to 2020). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s. l.], 2021.

ROSENBERRY, T. L. *et al.* Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 12, 2017.

RUSEK, M. *et al.* The Role of the JAK/STAT Signaling Pathway in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: New Potential Treatment Target. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], 2023.

RYSZKIEWICZ, P.; MALINOWSKA, B.; SCHLICKER, E. Polypharmacology: new drugs in 2023–2024. **Pharmacological Reports**, [s. l.], 2025.

SAHOO, B. M. *et al.* Drug Repurposing Strategy (DRS): Emerging Approach to Identify Potential Therapeutics for Treatment of Novel Coronavirus Infection. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], 2021.

SAKATA, R. P. Docking molecular, síntese e estudo biológico de potenciais inibidores da beta-secretase (BACE-1) e da acetilcolinesterase (ACHE). 2018. 182 f. Tese - Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2018.

KUMAR, H. M. S.; HERRMANN, L.; TSOGOEVA, S. B. Structural hybridization as a facile approach to new drug candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], 2020.

SARANRAJ, K.; KIRAN, P. U. Drug repurposing: Clinical practices and regulatory pathways. **Perspectives in Clinical Research**, [s. l.], 2024.

SARGSYAN, K.; GRAUFFEL, C.; LIM, C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 1518–1524, 2017.

SCHMID, N. *et al.* Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. **European Biophysics Journal**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 843–856, 2011.

SCOTT, I.; KUKSA, V. A.; KUBOTA, R. **Amine derivative compounds for treating ophthalmic diseases and disorders**. 2463151. Concessão: 10 mar. 2010.

SEHAR, U. *et al.* Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], 2022.

SELF, W. K.; HOLTZMAN, D. M. Emerging diagnostics and therapeutics for Alzheimer disease. **Nature Research**, [s. l.], 2023.

SERTKAYA, A. *et al.* Costs of Drug Development and Research and Development Intensity in the US, 2000-2018. **JAMA Network Open**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2024.

SETHI, A. *et al.* Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications. *In*: GAITONDE, V; KARMAKAR, P; TRIVEDI, A (org.). **Drug Discovery and Development - New Advances**. [S. l.]: IntechOpen, 2020. p. 1–21.

SHAKER, B. *et al.* *In silico* methods and tools for drug discovery. **Computers in Biology and Medicine**, [s. l.], v. 137, n. July, p. 104851, 2021.

SHAKIL, S.; FAHD, K. Molecular interaction of inhibitors with human brain butyrylcholinesterase. **Excli Journal**, [s. l.], v. 20, p. 1597–1607, 2021.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Screening of Multitarget-Directed Natural Compounds as Drug Candidates for Alzheimer's Disease Using *In Silico* Techniques: Their Extraction and In Vitro Validation. **ACS Omega**, [s. l.], 2023.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *In*: PROGRESS IN MEDICINAL CHEMISTRY. [S. l.], 2021. v. 60, p. 273–343.

STROET, M. *et al.* Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 5834–5845, 2018.

TAYLOR, P.; CAMP, S.; RADIC, Z. Acetylcholinesterase. **Encyclopedia of Neuroscience**, [s. l.], p. 5–7, 2009.

TRAN, T. S. *et al.* Synthesis, *in silico* and *in vitro* evaluation of some flavone derivatives for Acetylcholinesterase and BACE-1 inhibitory activity. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 18, 2020.

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**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 1–18, 2009.

- TSAGKARIS, A. S. *et al.* Screening of carbamate and organophosphate pesticides in food matrices using an affordable and simple spectrophotometric acetylcholinesterase assay. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2020.
- VALDÉS-TRESANCO, M. S. *et al.* gmx_MMPBSA: A new tool to perform end-state free energy calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 2021.
- VAN DER WESTHUIZEN, C. J. *et al.* Discovery of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors by Virtual Screening, *in vitro* screening, and Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 1550–1572, 2022.
- VERLI, H. Dinâmica Molecular. *In*: BIOINFORMÁTICA DA BIOLOGIA À FLEXIBILIDADE MOLECULAR. 1st. ed. São Paulo: SBBq, 2014. p. 173–187.
- VOLICER, L.; VOLICER, L.; VOLICER, Ladislav. Physiological and pathological functions of beta-amyloid in the brain and alzheimer's disease: A review. **Chinese Journal of Physiology**, [s. l.], 2020.
- WANG, E. *et al.* End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 119, n. 16, p. 9478–9508, 2019.
- WANG, X. *et al.* Regioselective alkylation of catechols via Mitsunobu reactions. **Synlett**, [s. l.], n. 19, p. 2947–2949, 2010.
- WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018.
- WIATRAK, B. *et al.* PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2020.
- WIJERATNE, T. *et al.* Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. **Int. J. Mol. Sci**, [s. l.], v. 2023, p. 3754, 2023.
- WINNEROSKI, L. L. *et al.* Preparation and biological evaluation of BACE1 inhibitors: Leveraging trans-cyclopropyl moieties as ligand efficient conformational constraints. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 115194, 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia**. [S. l.], 2025.
- WU, C. *et al.* Structure–activity relationship, *in vitro* and *in vivo* evaluation of novel dienylyl sulphonyl fluorides as selective BuChE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1860–1873, 2021.

XIE, D. *et al.* The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], 2023.

XIONG, B.; *et al.* Conformational flexibility of beta secretase: molecular dynamics simulation and essential dynamics analysis. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 25, n. 6, 2004.

YILDIZ, M. Docking studies suggest the important role of interactions among the catalytic dyad and inhibitors for designing Bace1 specific inhibitors. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1208, 2020.

ZENG, Z.; XU, J.; ZHENG, W. Artemisinin protects PC12 cells against β -amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. **Redox Biology**, [s. l.], v. 12, p. 625–633, 2017.

ZHANG, H. *et al.* IGF-1 reduces BACE-1 expression in PC12 cells via activation of PI3-K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 49–57, 2011.

ZHANG, Z. *et al.* Molecular Dynamics Revealing a Detour-Forward Release Mechanism of Tacrine: Implication for the Specific Binding Characteristics in Butyrylcholinesterase. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. August, p. 1–18, 2020.

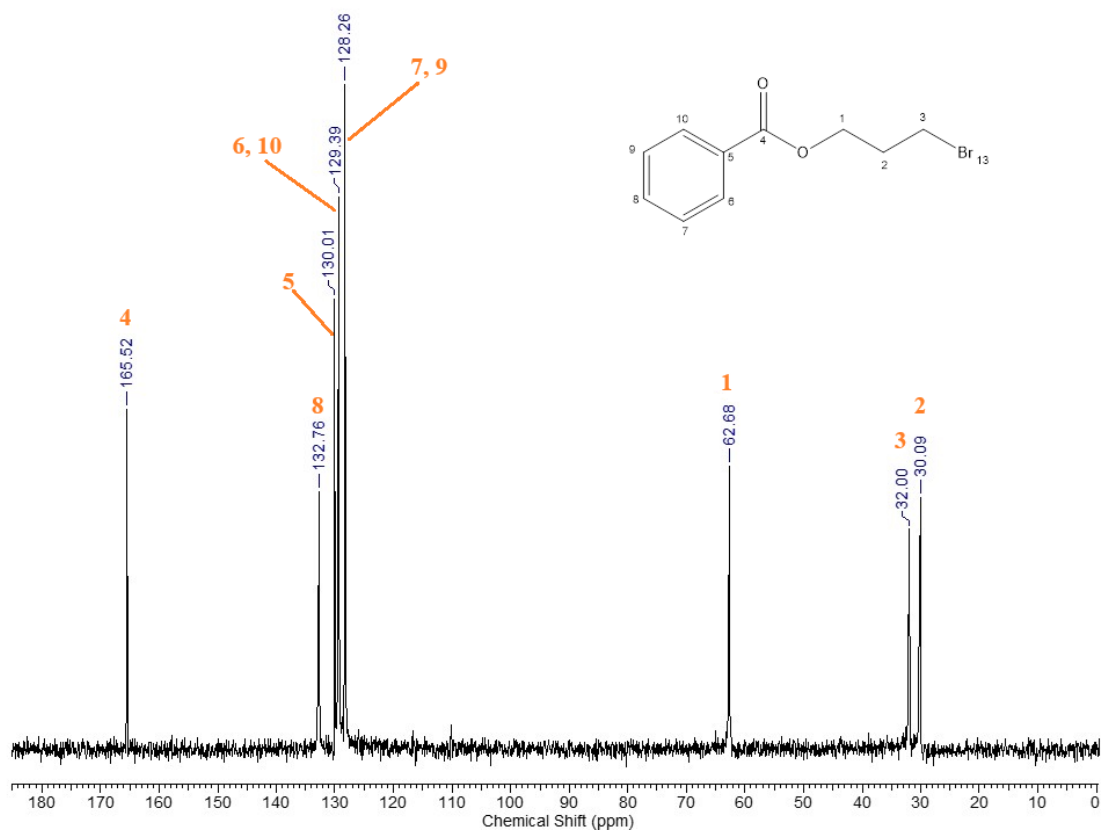
ZHAO, J. *et al.* Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], 2020.

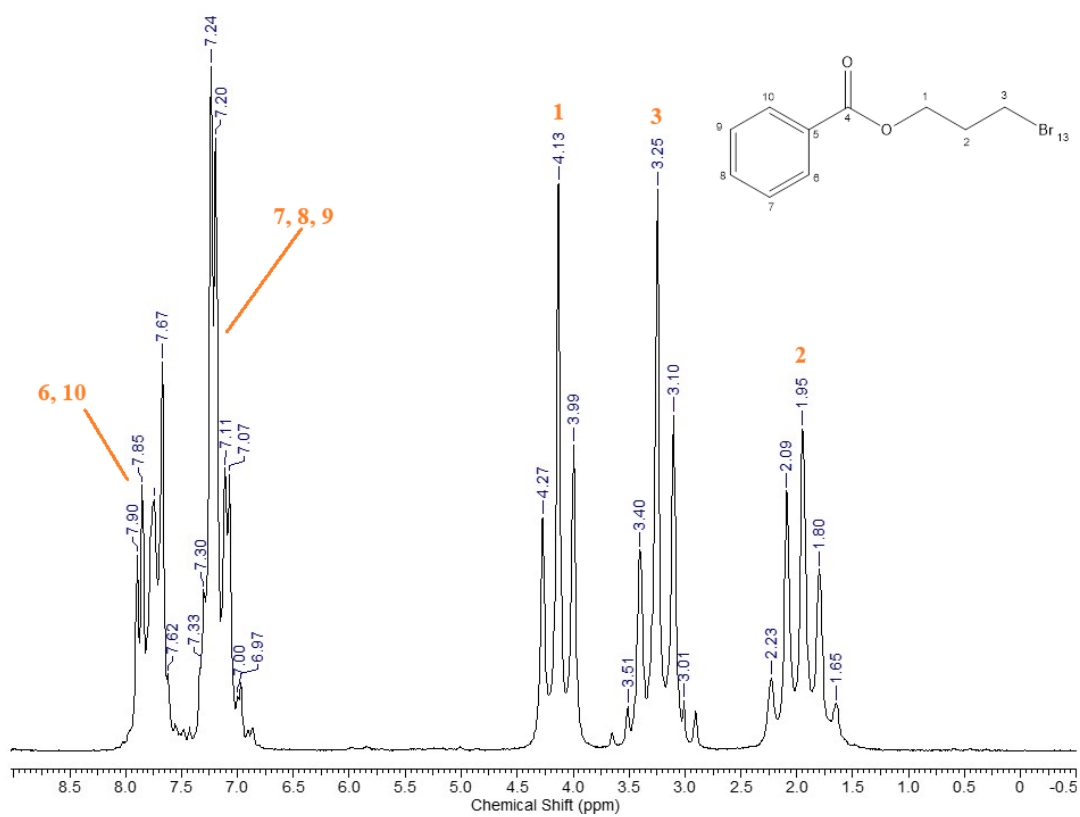
ZHAO, H.; CAFLISCH, A. Molecular dynamics in drug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], 2015.

ZHOU, J. *et al.* Rational Design of Multitarget-Directed Ligands: Strategies and Emerging Paradigms. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 20, p. 8881–8914, 2019.

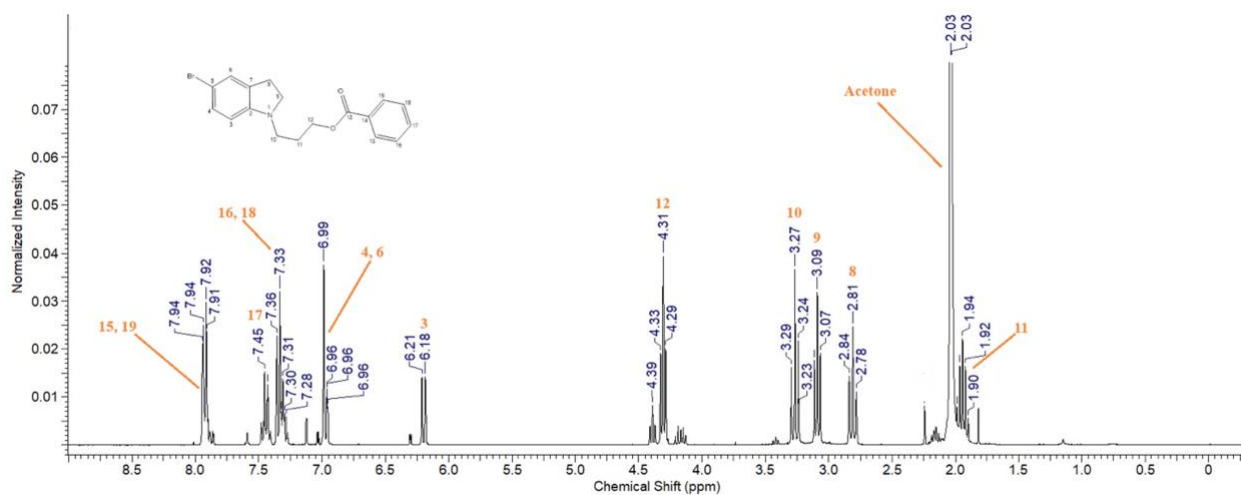
APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN ^1H E ^{13}C DOS PRODUTOS DE SÍNTESE DO DERIVADO S23

APÊNDICE A.1 Espectro de RMN ^{13}C do 3-bromopropil benzoato (INT1)

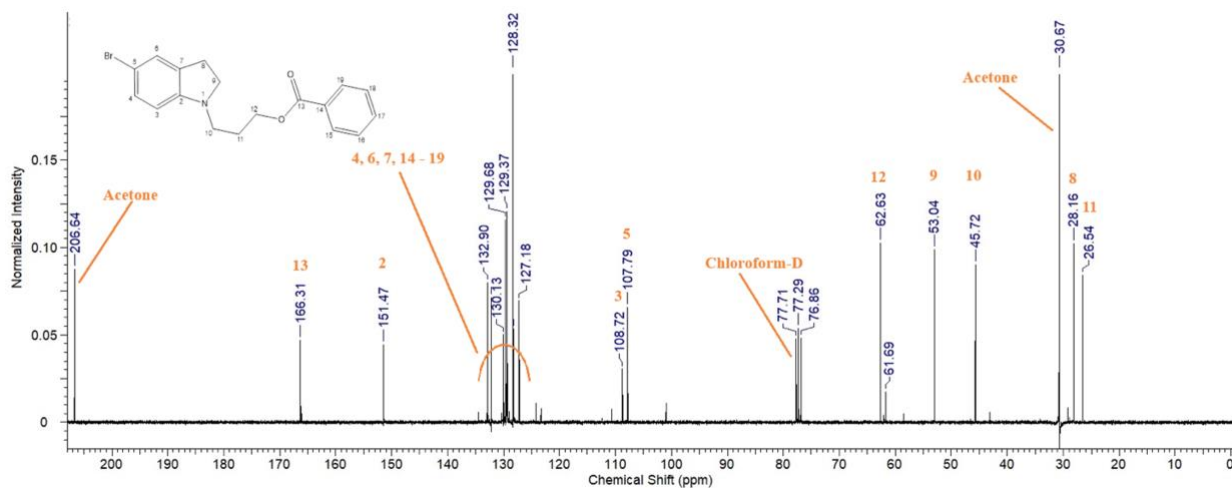


APÊNDICE A.2 Espectro de RMN ^{13}C do 3-bromopropil benzoato (INT1)

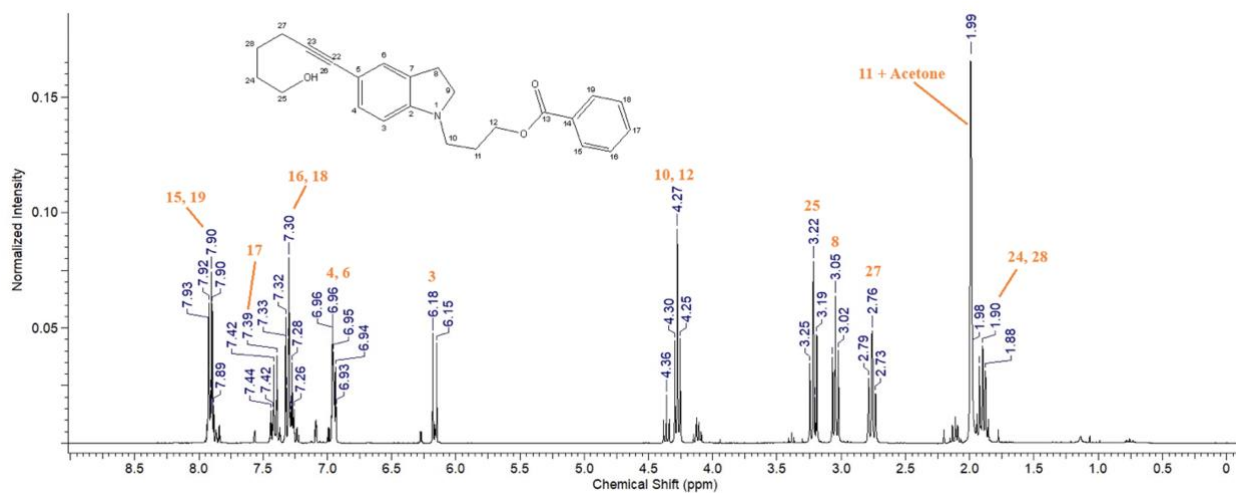
APÊNDICE A.3 Espectro de RMN ^1H do 3-(5-bromoindolin-1-il)propil benzoato (INT2)



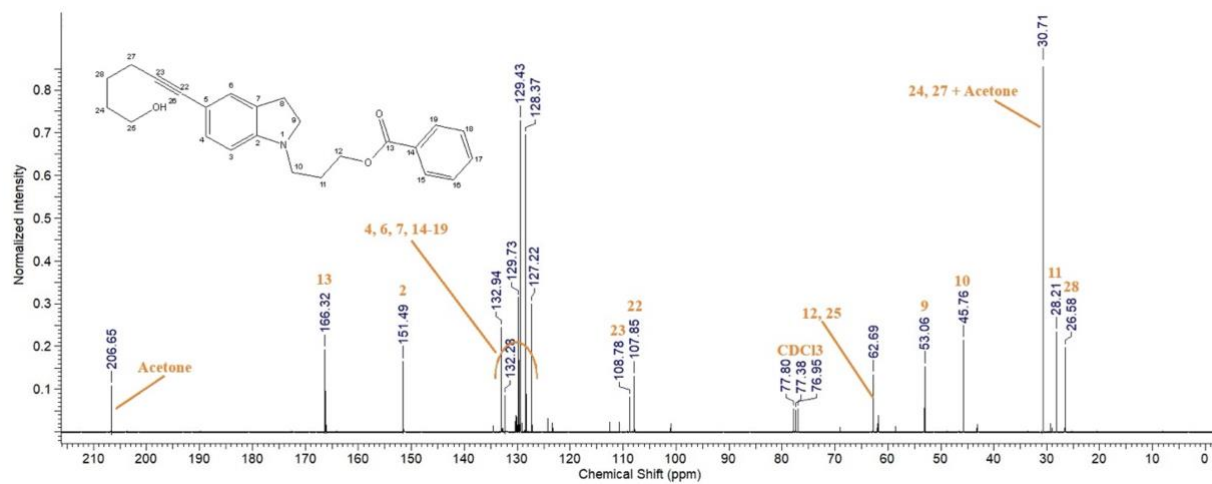
APÊNDICE A.4 Espectro de RMN ^{13}C do 3-(5-bromoindolin-1-il)propil benzoato (INT2)



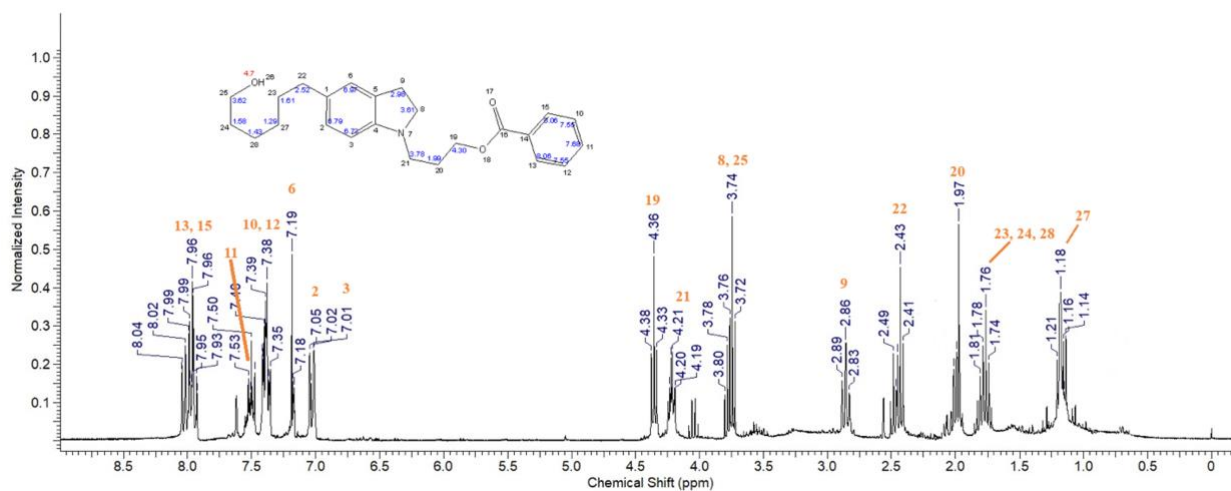
APÊNDICE A.5 Espectro de RMN ^1H do 3-(5-(6-bromohex-1-in-1-il)indolin-1-il)propil benzoato (INT3)



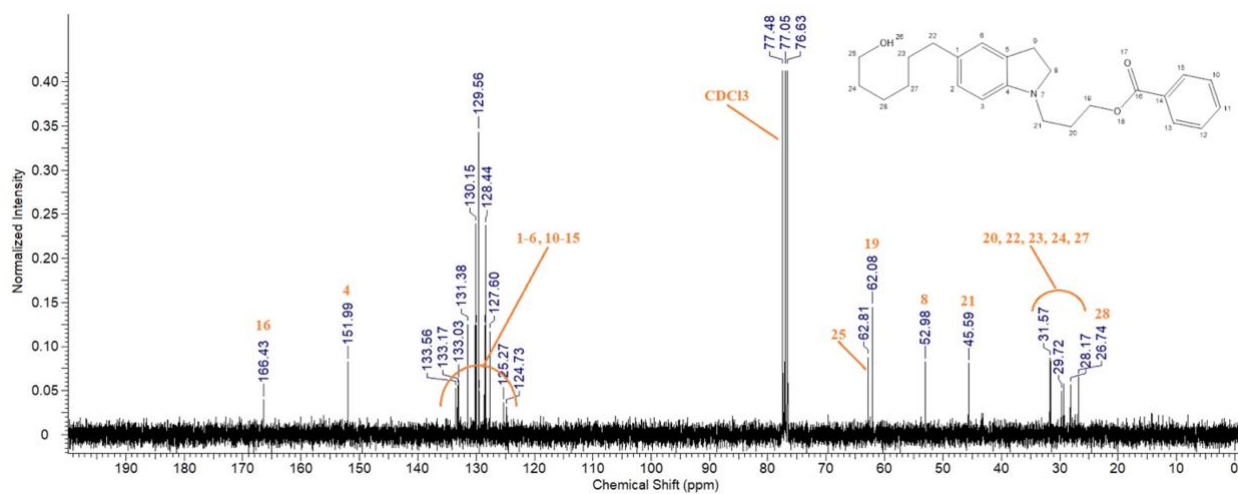
APÊNDICE A.6 Espectro de RMN ^{13}C do 3-(5-(6-bromohex-1-in-1-il)indolin-1-il)propil benzoato (INT3)



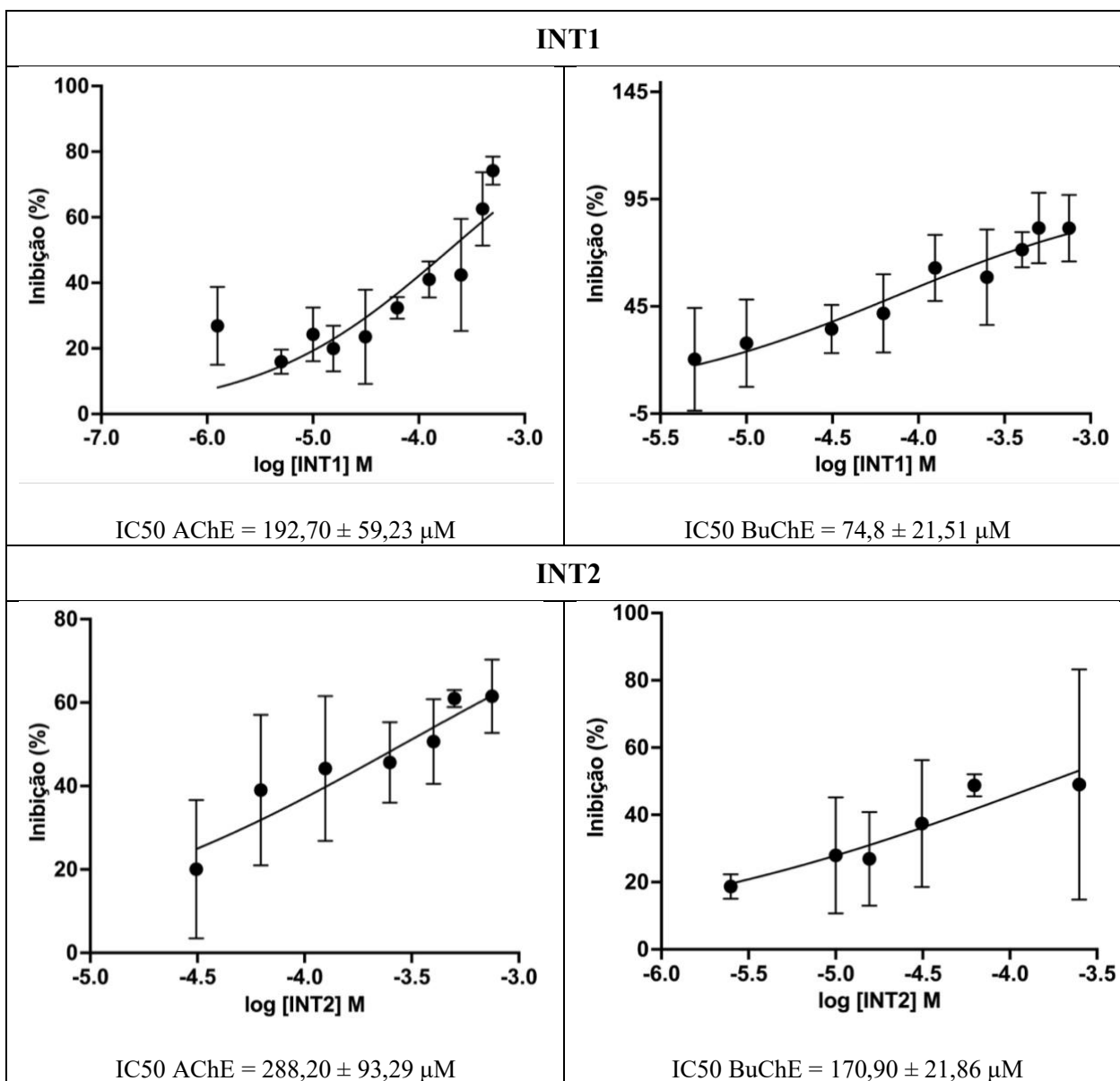
APÊNDICE A.7 Espectro de RMN ^1H do 3-(5-(6-bromohexil)indolin-1-il)propil benzoato (INT4)



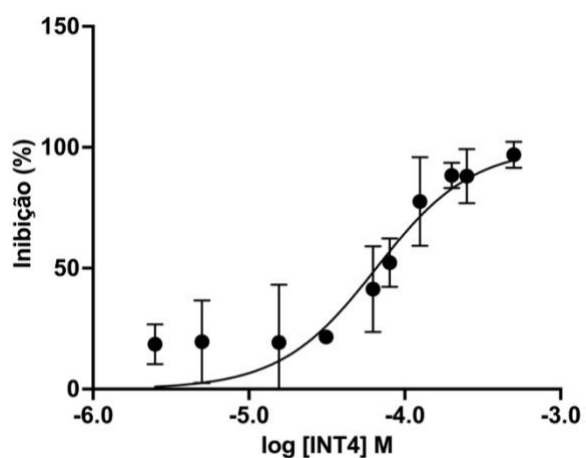
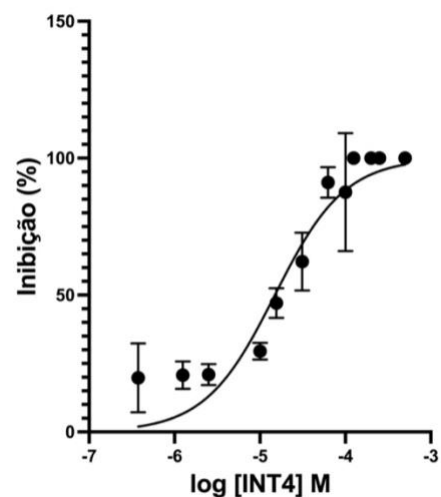
APÊNDICE A.8 Espectro de RMN ^{13}C do 3-(5-(6-bromohexil)indolin-1-il)propil benzoato (INT4)



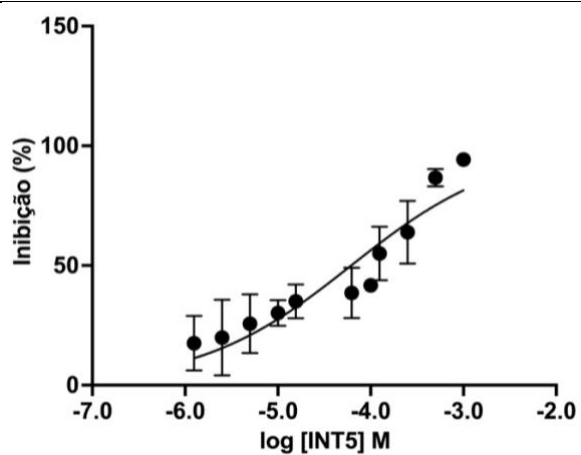
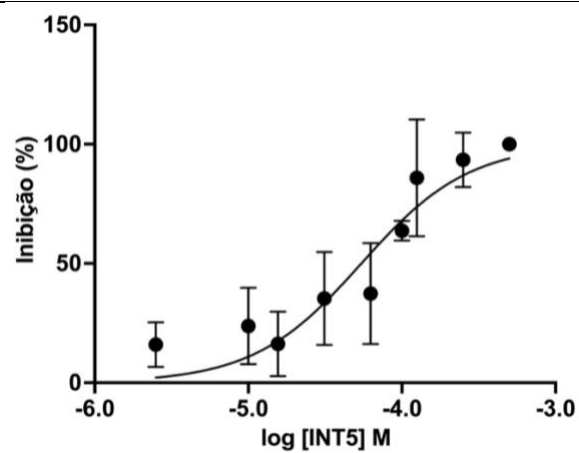
APÊNDICE B – GRÁFICOS DE IC₅₀ DOS PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA SÍNTESE DO DERIVADO S23



INT4

 $IC_{50} \text{ AChE} = 65,6 \pm 9,48 \mu\text{M}$  $IC_{50} \text{ BuChE} = 14,9 \pm 2,51 \mu\text{M}$

INT5

 $IC_{50} \text{ AChE} = 61,7 \pm 13,79 \mu\text{M}$  $IC_{50} \text{ BuChE} = 54,5 \pm 9,63 \mu\text{M}$

ANEXO A – DEPÓSITO DE PATENTE INTITULADA “USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER”

NÚMERO DO PROCESSO: BR 10 2024 023762 5



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 023762 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 21186804000105

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Praça Frei Orlando, 170 Centro

Cidade: São João Del Rei

Estado: MG

CEP: 36307-352

País: Brasil

Telefone: (32) 3379 2594

Fax:

Email: seipi@ufs.j.edu.br

Depositante 2 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 14045546000173

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte

Cidade: Feira de Santana

Estado: BA

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17220203000196

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: R. Álvares de Azevedo, 400 - Bela Vista

Cidade: Divinópolis

Estado: MG

CEP: 35503-822

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Resumo: A Doença de Alzheimer (DA) é, atualmente, um dos principais desafios de saúde pública mundial, caracterizada pelo declínio das habilidades cognitivas individuais. Por ser considerada uma doença multifatorial, o reposicionamento de fármacos que possam atuar diante de vários alvos de maneira concomitante se torna uma estratégia interessante para o tratamento da DA. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o novo uso do medicamento Silodosina como potencial inibidor da acetilcolinesterase (AChE), butilcolinesterase (BuChE) e beta-secretase 1 (BACE-1), principais enzimas envolvidas nas hipóteses de progressão da DA. Nos testes in vitro, a Silodosina apresentou boa habilidade de inibição da BuChE ($IC_{50} = 3.02 \mu M$). A concentração $3 \mu M$ também foi capaz de inibir atividade da BACE-1 de células PC12. Além disto, o comportamento molecular desses sistemas através do tempo foi avaliado por Simulação Dinâmica Molecular. Os resultados corroboram com os testes in vitro, uma vez que as análises RMSD e RMSF demonstraram que a Silodosina possui características moleculares que permitem a estabilização da AChE, BuChE e BACE-1, apesar da estabilização tardia dos complexos com a enzima AChE. Desta forma, estes resultados sugerem que a Silodosina pode ser útil como fármaco multialvo no tratamento da DA. A presente invenção demonstra o novo uso da Silodosina como inibidor multialvo no tratamento da DA.

Figura a publicar: 6

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 13

Nome: ALEX GUTTERRES TARANTO

CPF: 77108191687

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Dora Bittar Brighenti 118, Solar da Serra

Cidade: São João del Rei

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 13

Nome: ALISSON MARQUES DA SILVA

CPF: 02863615661

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Júlio Nogueira, 2521, Apto. 102

Cidade: Divinópolis

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 13

Nome: EDUARDO HABIB BECHELANE MAIA

CPF: 04792272688

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Inhazinha Epifânio, 131, Apt. 102

Cidade: Divinópolis

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 13

Nome: GÉSSICA OLIVEIRA MENDES

CPF: 05765795560

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua João Mateus de Souza, 96, Centro

Cidade: Conceição do Coité

Estado: BA

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 13

Nome: LAILA CRISTINA MOREIRA DAMÁZIO

CPF: 05048335619

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Milano, 161, Colônia do Marçal

Cidade: São João del Rei

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 6 de 13

Nome: DEYSE BRITO BARBOSA

CPF: 05256972502

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Dr. João Mangabeira, 1540, Brasília

Cidade: Feira de Santana

Estado: BA

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 7 de 13

Nome: TIAGO ALVES DE OLIVEIRA

CPF: 08499773630

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Neuza Gonçalves de Moares, 10, BL 9, Apto 103, Bairro Marajó

Cidade: Divinópolis

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 8 de 13

Nome: FRANCO HENRIQUE ANDRADE LEITE

CPF: 01231045566

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Reginaldo Muritiba do Lago, n. 220, condomínio Quartier

Cidade: Feira de Santana

Estado: BA

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 9 de 13

Nome: MICHEL PIRES DA SILVA

CPF: 04331481603

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Bahia 1401- AP 101

Cidade: Divinópolis

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 10 de 13

Nome: DANIEL LUCIANO FALKOSKI

CPF: 95303510034

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: rua Augusto Gali, número 85, bairro Solar da Serra

Cidade: São João del Rei

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 11 de 13

Nome: ISABELLA FLORES DE SOUZA MARRA

CPF: 12644194733

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Ministro Amâncio Lopes Salgado, 55

Cidade: Juiz de Fora

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 12 de 13

Nome: MARCELO SIQUEIRA VALLE

CPF: 02989138609

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Milano, 161, Colônia do Marçal

Cidade: São João del Rei

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 13 de 13

Nome: LORENA SILVA MATOS ANDRADE

CPF: 02653660547

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Dora Bittar Brighenti 118

Cidade: São João del Rei

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Desenho.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Procuração	Procuração e termo cefet.pdf
Procuração	procuração UEFS.pdf
Declaração dos inventores	Declarações dos inventores.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	COMPROVANTE DE PAGAMENTO.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

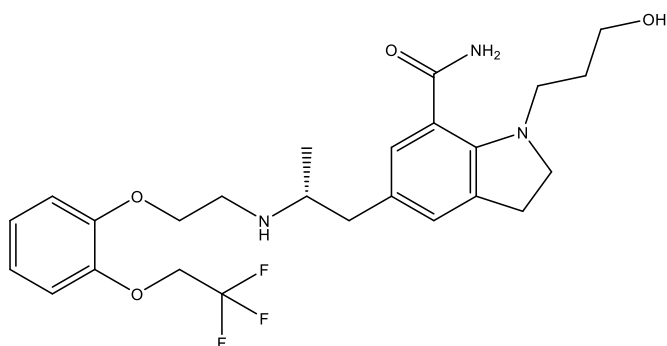
Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Campo de aplicação

[01] A presente invenção refere-se ao novo uso do composto Silodosina (1-(3-Hydroxypropyl)-5-[(2R)-2-({2-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenoxy]ethyl}amino)propyl]-2,3-dihydro-1H-indole-7-carboxamide - CAS 160970-54-7) como inibidor multialvo frente às enzimas acetilcolinesterase (AChE), butilcolinesterase (BuChE) e beta-secretase 1 (BACE-1) no tratamento da Doença de Alzheimer (DA). Todos os compostos utilizados foram obtidos na Sigma-Aldrich® (<https://www.sigmaaldrich.com/>).



Estado da técnica

[02] A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa crônica, caracterizada por alterações comportamentais e declínio cognitivo (ROSSELLI, M.; URIBE, I. V.; AHNE, E.; SHIHADDEH, L. Culture, Ethnicity, and Level of Education in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, v. 19, n. 1, p. 26–54, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13311-022-01193-z>>) que corresponde à forma mais comum de demência em todo o mundo e é a principal responsável por casos de declínio progressivo cognitivo nos idosos (WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dementia. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>). Os sintomas iniciais mais comuns são a perda da memória recente, apatia e depressão (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023). Entretanto, os sintomas característicos da doença só se manifestam anos após as mudanças patofisiológicas que ocorrem a nível neuronal, os quais são relacionados a

atrofia do tecido cerebral, acúmulo de proteína amilóide e morte celular (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023; MONFARED, A. A. T.; BYRNES, M. J.; WHITE, L. A.; ZHANG, Q. Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression. *Neurology and Therapy*, v. 11, n. 2, p. 553–569, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40120-022-00338-8>>; PARNETTI, L.; CHIPI, E.; SALVADORI, N.; D'ANDREA, K.; EUSEBI, P. Prevalence and risk of progression of preclinical Alzheimer's disease stages: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's Research and Therapy*, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2019; VAN DER SCHAAAR, J.; VISSER, L. N. C.; BOUWMAN, F. H.; KET, J. C. F.; SCHELTENS, P.; BREDENOORD, A. L.; VAN DER FLIER, W. M. Considerations regarding a diagnosis of Alzheimer's disease before dementia: a systematic review. *Alzheimer's Research and Therapy*, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13195-022-00971-3>>.). Apesar da identificação de vários biomarcadores para a caracterização da Doença de Alzheimer, sua patogênese ainda não foi totalmente elucidada. Mais de 95% dos casos desta doença não são determinados por condições genéticas, mas estão relacionados a uma série de mecanismos etiopatogênicos que caracterizam a doença de Alzheimer como multifatorial. Neste contexto, várias hipóteses têm sido propostas para explicar esta doença, dentre as quais a hipótese colinérgica e a amilóide são consideradas as mais importantes. A hipótese colinérgica diz respeito à redução dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica devido a alterações na função colinérgica e na atividade das colinesterases - acetilcolinesterase (AChE) e butilcolinesterase (BuChE), as quais são responsáveis pela hidrólise da acetilcolina (SAĞLIK, B. N.; ILGIN, S.; ÖZKAY, Y. Synthesis of new donepezil analogues and investigation of their effects on cholinesterase enzymes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 124, p. 1026–1040, 2016). Estas alterações são responsáveis por desencadear os sintomas característicos da doença de Alzheimer e, por esta razão, a inibição das colinesterases tem mostrado resultados positivos no tratamento de indivíduos com a doença. Por

sua vez, a hipótese amilóide está relacionada à formação de depósito extracelular do peptídeo β -amilóide. Neste processo, a β -secretase 1 (BACE-1) é responsável pela hidrólise da proteína precursora amilóide, gerando fragmentos de peptídeos que, posteriormente, se agregam e se depositam no ambiente extracelular do tecido neuronal (SAKATA, R. P. Docking molecular, síntese e estudo biológico de potenciais inibidores da beta-secretase (BACE-1) e da acetilcolinesterase (AChE). 2018. Universidade Estadual de Campinas, 2018v; SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Molecular Medicine, v. 8, n. 6, p. 595–608, 2016). Atualmente, os recursos disponíveis para o tratamento de pacientes com DA são limitados, uma vez que estes são baseados no controle dos sintomas e demonstram baixa eficácia e sérios efeitos adversos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023; NAJAFI, Z.; MAHDAVI, M.; SAEEDI, M.; KARIMPOUR-RAZKENARI, E.; ASATOURI, R.; VAFADARNEJAD, F.; MOGHADAM, F. H.; KHANAVI, M.; SHARIFZADEH, M.; AKBARZADEH, T. Novel tacrine-1,2,3-triazole hybrids: In vitro, in vivo biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 125, p. 1200–1212, 2017). Com a descoberta do papel da BACE-1 no progresso da DA, a indústria farmacêutica tem se esforçado para identificar inibidores desta enzima (TATULIAN, S. A. Challenges and hopes for Alzheimer's disease. Drug Discovery Today, v. 27, n. 4, 2022). Embora tenha havido alguns avanços com dois desenvolvimentos recentes, a validação mundial da eficácia ainda não está disponível.

[03] Considerando este cenário, o reposicionamento de fármacos já aprovados por agência reguladores e que atuem como inibidores multialvo no tratamento da DA se torna uma estratégia interessante. No presente pedido de patente, demonstramos que a Silodosina - um medicamento atualmente utilizado no tratamento de pacientes com hiperplasia prostática benigna - apresenta prospecção como inibidor multialvo das enzimas AChE, BuChE e BACE-1 para o tratamento da Doença de Alzheimer.

Problemas do estado da técnica

[04] Apesar do impacto em termos de saúde pública, os recursos disponíveis para tratamento de paciente com a Doença de Alzheimer são limitados, uma vez que estes se baseiam no controle dos sintomas, apresentando baixa eficiência e efeitos adversos sérios (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023; NAJAFI, Z.; MAHDAVI, M.; SAEEDI, M.; KARIMPOUR-RAZKENARI, E.; ASATOURI, R.; VAFADARNEJAD, F.; MOGHADAM, F. H.; KHANAVI, M.; SHARIFZADEH, M.; AKBARZADEH, T. Novel tacrine-1,2,3-triazole hybrids: In vitro, in vivo biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 125, p. 1200–1212, 2017). Além disto, estes medicamentos não são capazes de inibir ou retardar o processo de neuro degeneração. Alguns estudos concluíram que a maior parte do fracasso dos tratamentos atuais está associado à abordagem de um único alvo, considerando apenas uma das formas patológicas e negligenciando o aspecto multifatorial da Doença de Alzheimer. Entretanto, apesar dos benefícios, o desenvolvimento de fármacos multialvo é uma tarefa árdua e desafiadora (MORPHY, R.; KAY, C.; RANKOVIC, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discovery Today*, v. 9, n. 15, p. 641–651, 2004). Neste sentido, a indústria farmacêutica tem aproveitado o reposicionamento de fármacos como um caminho alternativo, utilizando fármacos aprovados por agências regulatórias para uma nova indicação.

Vantagens da invenção

[05] Estudos prévios utilizando estratégias *in silico* têm mostrado que o composto ZINC3806063, também conhecido como Silodosina tem requisitos estruturais que sugerem que este medicamento pode ser útil como um inibidor multialvo para o tratamento da Doença de Alzheimer. Atualmente, a Silodosina é um medicamento aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) utilizado no tratamento de pacientes com hiperplasia prostática benigna.

Breve descrição das Figuras

[06] **Figura 1:** Curva concentração-resposta do efeito anticolinesterásico *in vitro* da molécula Silodosina contra BuChE.

[07] **Figura 2:** RMSD (backbone) de estruturas da AChE (A – forma APO; B – complexo), BuChE (C – forma APO; D – complexo) e BACE-1 (E – forma APO; F – complexo) durante simulações DM.

[08] **Figura 3:** RMSF (Å) (backbone) de APO e complexos de AChE (A), BuChE (B) e BACE-1 (C) com Silodosina durante a fase produtiva. Os destaques em preto correspondem às regiões do site ativo.

[09] **Figura 4:** Taxa de permanência das interações de hidrogênio (ligação de hidrogênio) da Silodosina no sítio ativo de AChE, BuChE e BACE-1 durante a fase de produção e identificação dos pares envolvidos.

[010] **Figura 5:** Interações da Silodosina no sítio de ligação da AChE obtida da estrutura representativa da simulação DM (190,45 ns). As linhas curvas verdes representam interações hidrofóbicas; as linhas tracejadas verdes representam a interação pi-stacking; linhas tracejadas pretas representam ligações de hidrogênio viáveis.

[011] **Figura 6:** Interações da Silodosina no sítio de ligação da BuChE obtida da estrutura representativa da simulação DM (78,25 ns). As cores seguem o mesmo esquema da Figura 5.

[012] **Figura 7:** Interações de Silodosina no sítio de ligação BACE-1 obtido da estrutura representativa da simulação DM (88,3 ns). A cor segue o mesmo esquema da Figura 5.

[013] **Figura 8:** Energia livre de ligação e componentes calculados pelas ferramentas g_mmpbsa.

[014] **Figura 9:** Teste *in vitro* da citotoxicidade da Silodosina.

[015] **Figura 10:** Teste *in vitro* da atividade inibitória da BACE-pela Silodosina.

Descrição detalhada da Tecnologia

Ensaio enzimático para determinar a atividade anticolinesterásica *in vitro*

[016] A avaliação da atividade anticolinesterásica foi realizada como previamente descrito por Ellman e colaboradores (ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961), adaptada para microplacas de 96 poços, usando parâmetros cinéticos previamente determinados pelo grupo (DE ALMEIDA, R. B. M.; BARBOSA, D. B.; DO BOMFIM, M. R.; AMPARO, J. A. O.; ANDRADE, B. S.; COSTA, S. L.; CAMPOS, J. M.; CRUZ, J. N.; SANTOS, C. B. R.; LEITE, F. H. A.; BOTURA, M. B. Identification of a Novel Dual Inhibitor of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase: In Vitro and In Silico Studies. *Pharmaceuticals*, v. 16, n. 1, p. 95, 2023).

[017] As enzimas utilizadas foram a acetilcolinesterase do *Electrophorus electricus* tipo IV e butilcolinesterase obtida do soro equino. Também foi utilizado o reagente de Ellman (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) – DTNB), albumina de soro bovino (BSA), acetiltiocolina (ACTI) e a molécula de Silodosina. Todos estes materiais foram obtidos da Sigma-Aldrich®. Um leitor de microplaca MultiSkan FC foi utilizado para a avaliação espectrofotométrica, obtido da Thermo Scientific®. Para os ensaios com a enzima AChE, em cada poço foi adicionado 140 µL de tampão fosfato 0.1 M, pH 7.4, contendo 0,1% de BSA, 20 µL da amostra de Silodosina diluída em etanol, 20 µL da solução da enzima a 0,15 U/mL, 10 µL de DNTB a 0,01 M e 10 µL de ACTI 0,125 mM, similar ao protocolo descrito por Almeida e colaboradores (DE ALMEIDA, R. B. M.; BARBOSA, D. B.; DO BOMFIM, M. R.; AMPARO, J. A. O.; ANDRADE, B. S.; COSTA, S. L.; CAMPOS, J. M.; CRUZ, J. N.; SANTOS, C. B. R.; LEITE, F. H. A.; BOTURA, M. B. Identification of a Novel Dual Inhibitor of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase: In Vitro and In Silico Studies. *Pharmaceuticals*, v. 16, n. 1, p. 95, 2023). Para o ensaio com BuChE, por sua vez, foram adicionados 20 µL da solução da enzima a 0,50 U/mL e 10 µL de

ACTI 0,744 mM aos demais componentes reacionais. Para o cálculo dos valores de IC₅₀, a Silodosina foi testada em concentrações variando de 0,25 a 500 µM. O etanol foi utilizado como diluente das amostras e também como padrão negativo. Eserina (10 µL) foi utilizada como inibidor padrão em ambos ensaios. Os testes foram realizados em triplicata. A absorbância foi medida a 405 nM em ciclos durante 10 min para AChE e 20 min para BuChE.

Teste *in vitro* da citotoxicidade da Silodosina em células PC12.

[018] Células PC12 são células derivadas de feocromocitoma de ratos, amplamente utilizadas como modelo de estudo de células neurais para aplicação de ensaios farmacológicos *in vitro* e já demonstrou ser útil como modelo de estudo para desenvolvimento de drogas para a doença de Alzheimer (Xie, Danni et al. "The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells." *Frontiers in molecular neuroscience* vol. 15 1016559. 4 Jan. 2023, doi:10.3389/fnmol.2022.1016559) e estudo o efeito de IGF-1 na inibição da BACE-1 (Zhang, Hua et al. "IGF-1 reduces BACE-1 expression in PC12 cells via activation of PI3-K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways." *Neurochemical research* vol. 36,1 (2011): 49-57. doi:10.1007/s11064-010-0260-x).

[019] Para a realização dos testes de citotoxicidade *in vitro*, células PC12 foram cultivadas utilizando meio DMEM contendo 4.500 mg/mL de glicose (GIBCO) adicionado de 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 1% de antibiótico Streptomycina (100mg/mL) e Penicilina (100 UI/mL) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Sigma). Após confluência, as células foram desprendidas da placa de cultivo com uso de solução contendo tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02% e semeadas em placas de 96 poços (Kasvi) numa confluência de 1×10^4 por poço mantendo o mesmo meio e mesma suplementação. Após 24 horas, as células foram tratadas com controle veicular (DMSO a 0,1%) ou Silodosina nas concentrações de 1 µM e 10 µM diluídos em meio DMEM suplementado e sem SFB por 24 horas.

[020] Após 24 horas de incubação, performamos o teste de citotoxicidade por MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) utilizando o protocolo descrito por (Nascimento, Ravena P et al. "Involvement of astrocytic CYP1A1 isoform in the metabolism and toxicity of the alkaloid pyrrolizidine monocrotaline." *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* vol. 134 (2017): 41-49. doi:10.1016/j.toxicon.2017.04.005). Através deste teste, foi observado redução de viabilidade de células PC12 tratadas com Silodosina na concentração de 10 μ M (Mediana = 90,35 %, $P \leq 0,05$), quando comparado com o grupo controle (Mediana = 100 %) (Figura 9). O teste MTT se baseia na redução do MTT por desidrogenas, que estão abundantes nas mitocôndrias. O anel tetrazol se desfaz neste processo e forma o componente violeta azulado chamado de formazan. Uma vez que apenas células metabolicamente ativas reduzem o MTT, a viabilidade de células é estimada a partir da mensuração colorimétrica do formazan (Berridge, Michael V et al. "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." *Biotechnology annual review* vol. 11 (2005): 127-52. doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7). Os resultados obtidos através do teste MTT indicam que há um efeito da Silodosina na atividade de desidrogenases, que sugerem a redução de viabilidade em tratamentos com 10 μ M por 24 h.

Teste *in vitro* da atividade inibitória da BACE-pela Silodosina em células PC12.

[021] Realizamos o ensaio de atividade da BACE-1 a partir do kit β -Secretase Activity Fluorometric Assay Kit (código MAK237), Sigma-Aldrich em células da linhagem PC12 tratadas com o controle veicular (DMSO a 0,1%) ou Silodosina na concentração de 3 μ M por 24 h. Para tanto, as células PC12 foram cultivadas utilizando meio DMEM contendo 4.500 mg/mL de glicose (GIBCO) adicionado de 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 1% de antibiótico Streptomicina (100mg/mL) e Penicilina (100 UI/mL) e 10% de Soro

Fetal Bovino (SFB, Sigma). Após confluência, células foram desprendidas com uso de solução contendo tripsina a 0,05 % e EDTA a 0,02 % e plaqueadas em pacas de 6 poços na confluência de 5.2×10^4 por cm^2 por 24 horas. Decorrido o tempo, células foram tratadas com controle veicular (DMSO 0,003%) ou Silodosina (3 μM) diluído em meio DMEM suplementado, sem SFB. Após 24 horas de incubação, atividade enzimática foi quantificada a partir da unidade de fluorescência dividida pela quantidade de proteína total da amostra. Foi observado que a Silodosina diminuiu significativamente a atividade de BACE-1 (Mediana= 0,051; $p < 0,001$), quando comparado com o grupo controle (Mediana = 0,059) (Figura 10). Os níveis de atividade enzimática da BACE-1 detectados em grupo tratado com inibidor disponibilizado no kit foram menores que do grupo tratados com Silodosina (Mediana = 0,04590).

Dinâmica Molecular

[022] A forma APO das estruturas alvo e os alvos no complexo com a Silodosina foram analisados em simulações de dinâmica molecular (DM). As coordenadas 3D da Silodosina foram submetidas ao servidor ATB 3.0 (STROET, M.; CARON, B.; VISSCHER, K. M.; GEERKE, D. P.; MALDE, A. K.; MARK, A. E. Automated Topology Builder Version 3.0: Prediction of Solvation Free Enthalpies in Water and Hexane. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 14, n. 11, p. 5834–5845, 2018) para geração da sua tipologia. Os parâmetros de carga atômica, comprimento de ligação, ângulos de torção e diédricos foram obtidos usando campo de força GROMOS96 54A7 (SCHMID, N.; EICHENBERGER, A. P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal*, v. 40, n. 7, p. 843–856, 2011). As simulações de dinâmica molecular foram realizadas no pacote GROMACS 5.1.2 (ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAH, E. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from

laptops to supercomputers. *SoftwareX*, v. 1–2, p. 19–25, 2015) no qual foi adotado os parâmetros do campo de força GROMOS96 54A7, 25 °C como temperatura e pressão de 1 atm. As estruturas 3D da AChE, BuChE e BACE-1 foram obtidas do PDB (IDACHÉ: 4M0E; IDBuChE: 4BDS; IDBACE-1: 6UWP) do qual o ligante cristalográfico, moléculas de água e artefatos foram removidos. Regiões não modeladas foram construídas através do servidor SWISS-MODEL (WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; DE BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018). O estado de protonação dos resíduos-alvo foram ajustados no módulo *pdb2gmx* e implementado em GROMACS 5.1.2 de acordo com o pH 7.4 para colinesterases cholinesterases (MASCARENHAS, A. M. S.; DE ALMEIDA, R. B. M.; DE ARAUJO NETO, M. F.; MENDES, G. O.; DA CRUZ, J. N.; DOS SANTOS, C. B. R.; BOTURA, M. B.; LEITE, F. H. A. Pharmacophore-based virtual screening and molecular docking to identify promising dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796791>>) e pH 4.5 para BACE-1 (DOMÍNGUEZ, J. L.; CHRISTOPEIT, T.; VILLAYERDE, M. C.; GOSSAS, T.; OTERO, J. M.; NYSTRÖM, S.; BARAZNENOK, V.; LINDSTRÖM, E.; DANIELSON, U. H.; SUSSMAN, F. Effect of the protonation state of the titratable residues on the inhibitor affinity to BACE-1. *Biochemistry*, v. 49, n. 34, p. 7255–7263, 2010). Os valores de pKa dos resíduos foram avaliados no servidor H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/index.php>). Uma caixa dodecaédrica com modelo de água SPC-E (BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. *Journal of Physical Chemistry*, v. 91, n. 24, p. 6269–6271, 1987) foi usada para solvatar

o sistema, com distância mínima de 1.4 nm das bordas da caixa. Para neutralização, em sistemas envolvendo a enzima AChE (APO e complexo) 7 íons Na^{2+} foram adicionados, enquanto nos sistemas com as enzimas BuChE e BACE-1, 4 íons Cl^- foram adicionados. APO e os sistemas complexos foram minimizados em duas etapas: inicialmente pelo algoritmo Steepest Descent (SD) com 10.000 ciclos e, posteriormente, pelo algoritmo Conjugated Gradient (GC), com 1.000 ciclos. Após as etapas de minimização, a etapa de equilíbrio foi realizada ($t = 1 \text{ ns}$) e, finalmente, a dinâmica de produção sob 300K e 1 atm. O tempo da dinâmica de produção variou considerando aspectos de cada sistema: AChEapo = 100 ns; AChEcomplex = 200 ns; BuChEapo = 150 ns; BuChEcomplexo = 100 ns; BACE-1 apo e complexo = 100 ns. Módulos GROMACS (funções RMSD, RMSF e ligações de hidrogênio) foram utilizadas para analisar a estabilidade e comportamento de cada sistema. A energia livre de ligação dos complexos foi calculada por Mecânica Molecular/Método de área de superfície de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) (g_mmpbsa tool).

Ensaio enzimático para determinação da atividade anticolinesterásica *in vitro*

[023] Os ensaios enzimáticos revelaram que a Silodosina possui baixa habilidade para inibir a atividade da AChE ($\text{IC}_{50} > 500,0 \text{ } \mu\text{M}$) enquanto demonstra efeito satisfatório para inibição da atividade da BuChE ($\text{IC}_{50} = 3.02 \text{ } \mu\text{M}$).

[024] Cálculos de IC_{50} sugerem concentrações reduzidas de Silodosina podem inibir a atividade catalítica da BuChE, apesar da baixa afinidade pela AChE. Este resultado é similar ao que foi observado em estudos prévios de inibição dual, onde substâncias têm melhor perfil de inibição contra BuChE (CAVDAR, H.; SENTURK, M.; GUNEY, M.; DURDAGI, S.; KAYIK, G.; SUPURAN, C. T.; EKINCI, D. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with uracil derivatives: kinetic and computational studies. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, v. 34, n. 1, p. 429–437, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1543288>>; DE

ALMEIDA, R. B. M.; CONCEIÇÃO, R. S.; DA SILVA, K. S.; SANTOS JUNIOR, M. C.; BRANCO, A.; BOTURA, M. B. Ocotea daphnifolia: Phytochemical investigation, in vitro dual cholinesterase inhibition, and molecular docking studies. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 57, 2021; GUO, Y.; YANG, H.; HUANG, Z.; TIAN, S.; LI, Q.; DU, C.; CHEN, T.; LIU, Y.; SUN, H.; LIU, Z. Design, synthesis, and evaluation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase dual-target inhibitors against Alzheimer's diseases. Molecules, v. 25, n. 3, 2020; JOŃCZYK, J.; GODYŃ, J.; STAWARSKA, E.; MORAK-MŁODAWSKA, B.; JELEŃ, M.; PLUTA, K.; MALAWSKA, B. Dual action of dipyridthiazine and quinobenzothiazine derivatives-anticancer and cholinesterase-inhibiting activity. Molecules, v. 25, n. 11, 2020; LIU, P.; CHENG, M.; GUO, J.; CAO, D.; LUO, J.; WAN, Y.; FANG, Y.; JIN, Y.; XIE, S. S.; LIU, J. Dual functional antioxidant and butyrylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis and evaluation of novel melatonin-alkylbenzylamine hybrids. Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 78, 15 jan. 2023).

Dinâmica Molecular (DM)

[025] Além dos dados *in vitro*, simulações de dinâmica molecular foram realizadas para avaliar o comportamento como função do tempo de um ponto de vista atomístico (VERLI, H. Dinâmica Molecular. *Em*: Bioinformática da biologia à flexibilidade molecular. 1st. ed. São Paulo: SBBq, 2014. p. 173–187). Neste estudo, estas simulações avaliaram a estabilidade da Silodosina no sítio ativo das enzimas, as interações intermoleculares que são responsáveis por esta estabilidade e aspectos energético envolvendo os complexos. Para avaliar a estabilidade de simulações DM, a raiz do desvio quadrático médio (RMSD) foi inicialmente analisada. Esta é uma métrica que avalia a estabilidade estrutural do sistema através da análise de mudança conformacional na estrutura da proteína em comparação à estrutura de partida structure (SARGSYAN, K.; GRAUFFEL, C.; LIM, C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. Journal

[026] of Chemical Theory and Computation, v. 13, n. 4, p. 1518–1524, 2017).

[027] As simulações com os complexos (Silodosina ligada a AChE, BuChE e BACE-1) e as formas APO das proteínas tem seu RMSD para a cadeia principal (backbone) ao longo da trajetória. A avaliação RMSD em simulações de DM também permitem identificar nas trajetórias o momento em que os sistemas atingem o equilíbrio nas mudanças conformacionais (SARGSYAN, K.; GRAUFFEL, C.; LIM, C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. Journal of Chemical Theory and Computation, v. 13, n. 4, p. 1518–1524, 2017). Na maioria dos casos, foi possível observar a ocorrência de um aumento progressivo no valor do RMSD, do estágio inicial até o sistema estabilizado, considerando variações adequadas de RMSD abaixo de 3 Å (VERLI, H. Dinâmica Molecular. *Em*: Bioinformática da biologia à flexibilidade molecular. 1st. ed. São Paulo: SBBq, 2014. p. 173–187). Nestes estudos de simulação, foi possível observar a ocorrência de um equilíbrio antes de atingir 100 ns da simulação em sistemas contendo as proteínas em sua forma APO para AChE (60 a 100 ns) e para BACE-1 (40 a 100 ns) mas não para BuChE. Para esta, foi necessário estender o tempo de simulação até 150 ns (110 a 150 ns). Nos sistemas contendo o ligante, por sua vez, o equilíbrio foi alcançado em um tempo menor para a BuChE (25 a 100 ns) e para a BACE-1 (65 a 100 ns). Para o sistema contendo AChE complexado à Silodosina, por sua vez, 100 ns não foram suficientes para o período de estabilização. Por esta razão, o tempo de simulação foi estendido para 200 ns. Desta forma, foi possível observar que este sistema alcança o equilíbrio num tempo de simulação de 165 ns (165 a 200 ns). Este resultado corrobora com o resultado observado no teste de inibição, no qual a molécula testada não foi capaz de inibir adequadamente a atividade enzimática.

[028] Valores de RMSD consistem numa métrica de avaliação que trazem uma importante informação, que considera toda a estrutura da proteína. Além desta métrica, é possível avaliar as flutuações atômicas dos resíduos individualmente calculando a Flutuação quadrática média (RMSF), para analisar as alterações que ocorrem em regiões específicas das proteínas (como nos sítios de ligação). Por esta razão, gráficos de flutuação dos resíduos para a forma APO foram gerados e comparados com os gráficos, dos respectivos complexos com Silodosina, durante os intervalos de tempo nos quais o sistema estava em equilíbrio (fase produtiva). Os dados revelam que a flutuação atômica do complexo com a enzima AChE ($\text{RMSF} = 0,9 \pm 0,5 \text{ \AA}$) é estatisticamente semelhante à flutuação da forma APO ($\text{RMSF} = 0,8 \pm 0,4 \text{ \AA}$). As regiões do sítio ativo seguiram um perfil de flutuação semelhante tanto na forma complexada quanto na forma APO, o que sugere que a presença do ligante não promove alterações conformacionais significativas na estrutura da proteína. As regiões com maior flutuação correspondem à região do loop, que se caracteriza pela flexibilidade conformacional. Por outro lado, as flutuações atômicas da forma APO da BuChE ($\text{RMSF} = 1,0 \pm 0,5 \text{ \AA}$) e na forma complexada ($\text{RMSF} = 0,9 \pm 0,4 \text{ \AA}$) sugerem que o segundo sistema é mais estável. Em sistemas contendo BACE-1 ($\text{RMSF}_{\text{APO}} = 1,1 \pm 0,4 \text{ \AA}$ e $\text{RMSF}_{\text{Complexo}} = 0,7 \pm 0,4 \text{ \AA}$) os efeitos do ligante na flutuação atômica são ainda mais pronunciados, sugerindo maior estabilidade para a forma complexada. A região de resíduos catalíticos apresenta baixa flutuação em ambos os sistemas, o que demonstra que não houve alterações significativas na conformação do sítio nas simulações. Porém, é possível observar uma maior flutuação entre os resíduos Val67-Glu77 no sistema APO em relação ao sistema complexado, o que sugere que a Silodosina realiza interações que impedem a abertura do flap loop e, possivelmente, inibem a atividade catalítica do BACE-1, semelhante ao observado em estudos anteriores (DO BOMFIM, M. R.; BARBOSA, D. B.; DE CARVALHO, P. B.; DA SILVA, A. M.;

DE OLIVEIRA, T. A.; TARANTO, A. G.; LEITE, F. H. A. Identification of potential human beta-secretase 1 inhibitors by hierarchical virtual screening and molecular dynamics. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2069155>>). Tal consideração fica evidenciada ao observar as regiões do sítio ativo destacadas no gráfico, nas quais o sistema sem ligante apresenta flutuações mais evidentes. Essa característica pode ser explicada pelo fato da enzima, em condições fisiológicas, alterar sua conformação para permitir a entrada do substrato no sítio ativo (FANG, L.; YONGMEI, P.; JENNIFER, L. M.; CHANG-GUO, Z. Active Site Gating and Substrate Specificity of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 115, n. 27, p. 8797–8805, 2011.). As informações obtidas nas análises de RMSD e RMSF demonstram que a Silodosina possui características moleculares que permitem a estabilização da estrutura da AChE, BuChE e BACE-1, apesar da estabilização tardia dos sistemas da AChE. O processo decorre de interações intermoleculares que são estabelecidas entre ligantes e resíduos proteicos, e essas interações dão origem a resposta biológica. Neste contexto, as ligações de hidrogênio são consideradas importantes na biologia devido à sua força que é suficiente para manter duas moléculas unidas para dar-lhe uma estrutura definida em um estado fundamental de complexo (BUCKINGHAM, A. D.; DEL BENE, J. E.; MCDOWELL, S. A. C. The hydrogen bond. *Chemical Physics Letters*, v. 463, n. 1–3, p. 1–10, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2008.06.060>>). No sítio ativo da AChE foi observado que a Silodosina estabelece ligação de hidrogênio durante a maior parte da fase produtiva entre o oxigênio da hidroxila da cadeia lateral e Glu285 (63,5%). Além disso, o Trp286 interage com a amina terciária do ligante (19%); o nitrogênio da amida ligado ao grupo indol estabelece ligações de hidrogênio com Val282 (33,6%) e Asn283 (24,1%); e o oxigênio ligado ao

anel benzil com Glu282 (24,8%). No sítio ativo da BuChE, por sua vez, existem importantes ligações de hidrogênio estabelecidas entre o oxigênio ligado ao grupo indol e Gln119 (19,6%) e Asn289 (80,3%), e o nitrogênio do mesmo grupo e Thr284 (55,1%) e Ser287 (45,8%). Também foi observada uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da hidroxila da Silodosina e o Phe278 (14,0%). Em ambas as colinesterases é possível notar que os resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio de longa permanência são resíduos localizados na região periférica dos sítios ativos (DE BOER, D.; NGUYEN, N.; MAO, J.; MOORE, J.; SORIN, E. J. A comprehensive review of cholinesterase modeling and simulation. *Biomolecules*, v. 11, n. 4, 2021), o que pode indicar que o ligante é capaz de estabilizar o sítio e inibir a entrada do substrato no sítio ativo. Porém, é importante lembrar que para o complexo contendo a enzima AChE, a análise foi realizada nas fases posteriores da simulação. No sítio ativo da BACE-1, são observadas ligações de hidrogênio durante mais de 10% da fase produtiva com a díade catalítica, entre nitrogênio da amida terciária e Asp32 (14,0%) e o nitrogênio da formamida e Asp228 (33,3%). Essas interações são relatadas em estudos anteriores com inibidores BACE-1, o que sugere que a Silodosina pode inibir sua atividade catalítica (TRAN, T. S.; TRAN, T. D.; TRAN, T. H.; MAI, T. T.; NGUYEN, N. Le; THAI, K. M.; LE, M. T. Synthesis, in Silico and in vitro evaluation of some flavone derivatives for Acetylcholinesterase and BACE-1 inhibitory activity. *Molecules*, v. 25, n. 18, 1 set. 2020; YILDIZ, M. Docking studies suggest the important role of interactions among the catalytic dyad and inhibitors for designing Bace1 specific inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, v. 1208, 15 maio 2020). Os resíduos localizados na região do flap também estão envolvidos nas ligações de hidrogênio, como Thr72 e oxigênio da hidroxila (18,5%), e oxigênio ligado ao anel benzil e Trp76 (28,5%). Além disso, o oxigênio hidroxila está envolvido na ligação de hidrogênio com Tyr198 (14,8%), e o oxigênio da formamida interage com Arg235 (40,2%) e Thr329

(42,5%). Embora as ligações de hidrogênio sejam importantes para a estabilização dos sistemas, elas não são as únicas responsáveis pela manutenção das estruturas e pela resposta biológica. Neste contexto, é importante avaliar as interações de outra natureza que sejam possíveis de serem condicionais entre ligante-proteína e, como as simulações DM são dinâmicas, é necessário escolher a estrutura representativa do processo. A estrutura representativa corresponde a uma representação gráfica através da análise de diferentes valores de RMSD para determinar um valor máximo de RMSD entre conformações. As avaliações indicaram que para sistemas complexos o valor RMSD mais adequados para usar como ponto de corte para as colinesterases foi de 1,2 Å, e 1,1 Å para BACE-1. As estruturas específicas foram a conformação no tempo de 190,45 ns para AChE-Silodosina, 78,25 ns para BuChE-Silodosina e 88,3 ns para BACE-1-Silodosina. As representações gráficas são mostradas nas Figuras 5, 6 e 7.

[029] O mapa representativo de interação estrutural da Silodosina complexada com a AChE mostra que a cadeia lateral do ligante do anel benzil é capaz de estabelecer interações hidrofóbicas com os resíduos Trp286 e Ser293. O benzil também interage com o Trp286 por meio de uma interação pi-stacking, e essa interação parece ser importante para a inibição da AChE (HONORIO, P.; SAINIMNUAN, S.; HANNONGBUA, S.; SAPARPAKORN, P. Binding interaction of protoberberine alkaloids against acetylcholinesterase (AChE) using molecular dynamics simulations and QM/MM calculations. *Chemico-Biological Interactions*, v. 344, 1 ago. 2021; VAN DER WESTHUIZEN, C. J.; STANDER, A.; RILEY, D. L.; PANAYIDES, J. L. Discovery of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors by Virtual Screening, in *Vitro Screening, and Molecular Dynamics Simulations*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 62, n. 6, p. 1550–1572, 2022). O grupo indol do ligante também estabelece interações hidrofóbicas com o resíduo Leu76. Observam-se também duas ligações de hidrogênio neste mapa, entre a hidroxila da cadeia

lateral do indol e Glu285 e entre o oxigênio do grupo formamida e o resíduo Trp286.

[030] O mapa representativo de interação estrutural da Silodosina complexada com BuChE mostra que a região do grupo indol estabelece interações hidrofóbicas com Thr120 e Pro285. Este resíduo Pro285 tem estado envolvido em interações com inibidores de BuChE (LIU, Y.; TU, Y.; KANG, Y.; ZHU, C.; WU, C.; CHEN, G.; LIU, Z.; LI, Y. Biological evaluation, molecular modeling and dynamics simulation of phenanthrenes isolated from *Bletilla striata* as butyrylcholinesterase inhibitors. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17912-7>>; SHAKIL, S.; FAHD, K.; ARABIA, S.; ARABIA, S.; MEDICAL, K. F.; ARABIA, S. Original article : MOLECULAR INTERACTION OF INHIBITORS WITH. p. 1597–1607, 2021), e Thr120 tem sido relacionado como um dos resíduos mais envolvidos na estabilização de complexos BuChE (LIU, Y.; TU, Y.; KANG, Y.; ZHU, C.; WU, C.; CHEN, G.; LIU, Z.; LI, Y. Biological evaluation, molecular modeling and dynamics simulation of phenanthrenes isolated from *Bletilla striata* as butyrylcholinesterase inhibitors. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17912-7>>; SHAKIL, S.; FAHD, K.; ARABIA, S.; ARABIA, S.; MEDICAL, K. F.; ARABIA, S. Original article: MOLECULAR INTERACTION OF INHIBITORS WITH. p. 1597–1607, 2021; ZHANG, Z.; FAN, F.; LUO, W.; ZHAO, Y.; WANG, C. Molecular Dynamics Revealing a Detour-Forward Release Mechanism of Tacrine: Implication for the Specific Binding Characteristics in Butyrylcholinesterase. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, n. August, p. 1–18, 2020). Além disso, o oxigênio do grupo formamida interage com ambas as amidas do Asn289, interação que foi demonstrada durante mais de 80% da simulação (Figura 4). Essas interações também têm sido relatadas como importantes para a inibição da BuChE, pois estão relacionadas à manutenção do inibidor dentro do sítio e ao bloqueio do acesso ao substrato (ZHANG, Z.; FAN, F.; LUO, W.; ZHAO, Y.;

WANG, C. Molecular Dynamics Revealing a Detour-Forward Release Mechanism of Tacrine: Implication for the Specific Binding Characteristics in Butyrylcholinesterase. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, n. August, p. 1–18, 2020).

[031] O mapa de interação estrutural representativo da Silodosina complexada com BACE-1 ilustra as ligações de hidrogênio com os resíduos Thr72 e Thr329. O resíduo Thr329 também estabelece interações hidrofóbicas com a cadeia lateral. Além disso, o anel benzênico da Silodosina estabelece interações pi-stacking com Tyr71 e o grupo trifluoreto ligado ao anel também estabelece interações hidrofóbicas com Tyr71. Os resíduos Tyr71 e Thr72 são considerados relevantes para o desenvolvimento de inibidores BACE-1, pois estão localizados no flap loop e são responsáveis pela manutenção conformacional (DO BOMFIM, M. R.; BARBOSA, D. B.; DE CARVALHO, P. B.; DA SILVA, A. M.; DE OLIVEIRA, T. A.; TARANTO, A. G.; LEITE, F. H. A. Identification of potential human beta-secretase 1 inhibitors by hierarchical virtual screening and molecular dynamics. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2069155>>). Tyr71 também está envolvido no intermediário tetraédrico da catálise, o que revela que a Silodosina desencadeia interações capazes de inibir a atividade catalítica da BACE-1.

[032] Além da importância das interações intermoleculares, a maioria dos processos moleculares, incluindo associação molecular e reações químicas, são guiados por energias livres de ligação (WANG, E.; SUN, H.; WANG, J.; WANG, Z.; LIU, H.; ZHANG, J. Z. H.; HOU, T. End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. *Chemical Reviews*, v. 119, n. 16, p. 9478–9508, 2019). Nesse contexto, a força de uma interação biomolecular envolvida no reconhecimento da inibição pode ser quantificada avaliando sua energia livre (KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 54, n. 7,

p. 1951–1962, 2014) e, por esse motivo, é importante avaliar aspectos termodinâmicos de complexos entre Silodosina e as enzimas AChE, BuChE e BACE-1. Como os programas de docking não consideram a flexibilidade das proteínas e simplificam as funções energéticas (HAMED, M. Y. Prediction of drug potencies of bace1 inhibitors: A molecular dynamics simulation and MM_GB(PB)SA scoring. *Computation*, v. 8, n. 4, p. 1–24, 2020), o Método da Mecânica Molecular Poisson Boltzmann (MM/PBSA) foi aplicado às fases de produção de simulações de sistemas complexos e os resultados estão expressos na Tabela 1 e Figura 7.

[033] **Tabela 1.** Energia livre de ligação e componentes calculados pelas ferramentas g_mmpbsa

System	E_{vdW} (kJ/mol)	E_{elec} (kJ/mol)	G_{MM} (kJ/mol)	G_{polar} (kJ/mol)	$G_{nonpolar}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{binding}$ (kJ/mol)
AChE-Silodosin	-0.001	0.046	0.045	-1.313	-3.854	-1.489
BuChE-Silodosin	-167.952	-24.197	-192.149	115.276	-4.224	-93.422
BACE-1-Silodosin	-24.429	-4.179	-28.608	15.106	1.605	-15.768

[034] O método MM/PBSA corresponde a uma estratégia versátil que permite estimar a energia livre de ligação e atinge um bom equilíbrio entre confiabilidade dos resultados e eficiência (VALDÉS-TRESANCO, M. S.; VALDÉS-TRESANCO, M. E.; VALIENTE, P. A.; MORENO, E. gmx_MMPBSA: A new tool to perform end-state free energy calculations with GROMACS. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 2021). Utilizando este método, é possível observar que a energia livre de ligação da AChE complexada à Silodosina corresponde a -1,489 kJ/mol, e as interações de van der Waals não são significativas para a estabilização do complexo. Estes resultados ilustram que a associação ligante e proteína não é propensa a ocorrer e corroboram o que foi observado em testes *in vitro*, nos quais a Silodosina não demonstrou grande capacidade de inibir a atividade catalítica da AChE. Além disto, estudos anteriores com moléculas de referência com atividade inibitória à AChE como galantamina e rivastigmina

mostraram maiores valores de energia livre de ligação e de contribuição energética de van der Waals (PASCOINI, A. L.; FEDERICO, L. B.; ARÊAS, A. L. F.; VERDE, B. A.; FREITAS, P. G.; CAMPS, I. In silico development of new acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 37, n. 4, p. 1007–1021, 2019. Disponível em: <<http://doi.org/10.1080/07391102.2018.1447513>>).

[035] Por outro lado, a energia livre de ligação da BuChE complexada com Silodosina corresponde a -93,422 kJ/mol, o que corrobora a estabilidade alcançada por este sistema e o valor de inibição observado in vitro. Este valor mostra que este composto é capaz de criar um sistema mais estável com BuChE do que o donepezil e outros compostos ativos, e as interações de van der Waals desempenham um papel essencial neste processo, semelhante ao observado em estudos anteriores (ADALAT, B.; RAHIM, F.; REHMAN, W.; ALI, Z.; RASHEED, L.; KHAN, Y.; FARGHALY, T. A.; SHAMS, S.; TAHA, M.; WADOOD, A.; SHAH, S. A. A.; ABDELLATIF, M. H. Biologically Potent Benzimidazole-Based-Substituted Benzaldehyde Derivatives as Potent Inhibitors for Alzheimer's Disease along with Molecular Docking Study. *Pharmaceuticals*, v. 16, n. 2, 1 fev. 2023; AL-JOUFI, F. A.; SHAH, S. W. A.; SHOAB, M.; GHAS, M.; SHAFIULLAH; KHALIL, A. A. K.; JAMAL, S. B.; SHAH, S. M. H.; ZAHOR, M. Flavonoid Derivatives as Potential Cholinesterase Inhibitors in Scopolamine-Induced Amnesic Mice: An In Vitro, In Vivo and Integrated Computational Approach. *Brain Sciences*, v. 12, n. 6, 1 jun. 2022). Além disso, as ligações de hidrogênio também estão envolvidas no processo de estabilização. Para o sistema BACE-1, a energia livre de ligação é de -15,768 kJ/mol, e as interações de van der Waals também são mais importantes para a estabilização. Para mais, as ligações de hidrogênio devem ser importantes para a estabilização dos sistemas, o que corrobora as interações de longa permanência observadas na Figura 4. Esses resultados são semelhantes aos observados em estudos de dinâmica molecular para inibidores BACE-1 (GUTIÉRREZ, L. J.; PARRAVICINI, O.; SÁNCHEZ, E.;

RODRÍGUEZ, R.; COBO, J.; ENRIZ, R. D. New substituted aminopyrimidine derivatives as BACE1 inhibitors: in silico design, synthesis and biological assays. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 37, n. 1, p. 229–246, 2 jan. 2019; SRIVASTAVA, S.; SHARMA, S.; DEEP, S.; KHARE, S. K. Screening of Multitarget-Directed Natural Compounds as Drug Candidates for Alzheimer's Disease Using In Silico Techniques: Their Extraction and In Vitro Validation. *ACS Omega*, 17 out. 2023).

REIVINDICAÇÕES

1. Uso da Silodosina, caracterizado por ser aplicado no tratamento da doença de Alzheimer.
2. Uso da Silodosina, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por possuir as concentrações de $IC_{50} > 500,0 \mu M$ para a enzima AChE, $IC_{50} = 3.02 \mu M$ para enzima BuChE e $3 = \mu M$ para a enzima BACE-1.

FIGURAS

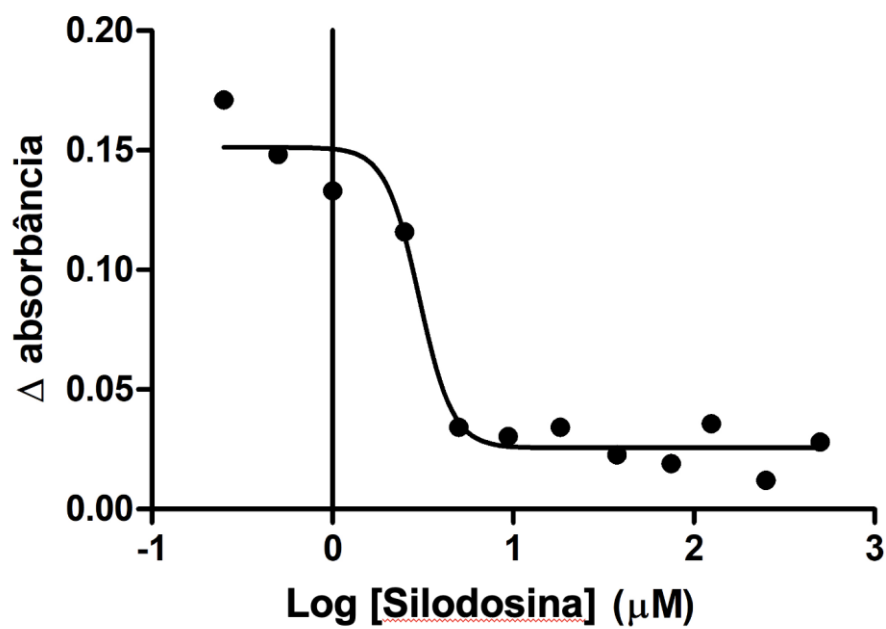
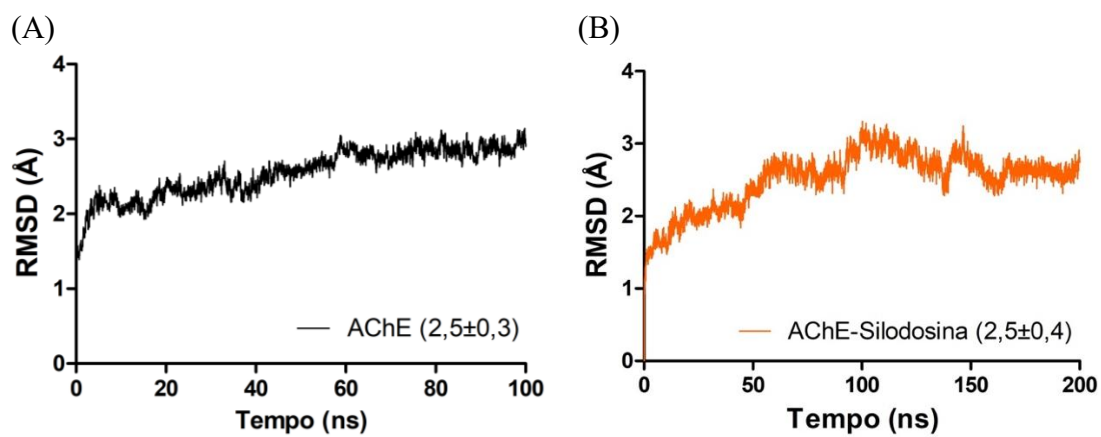


Figura 1



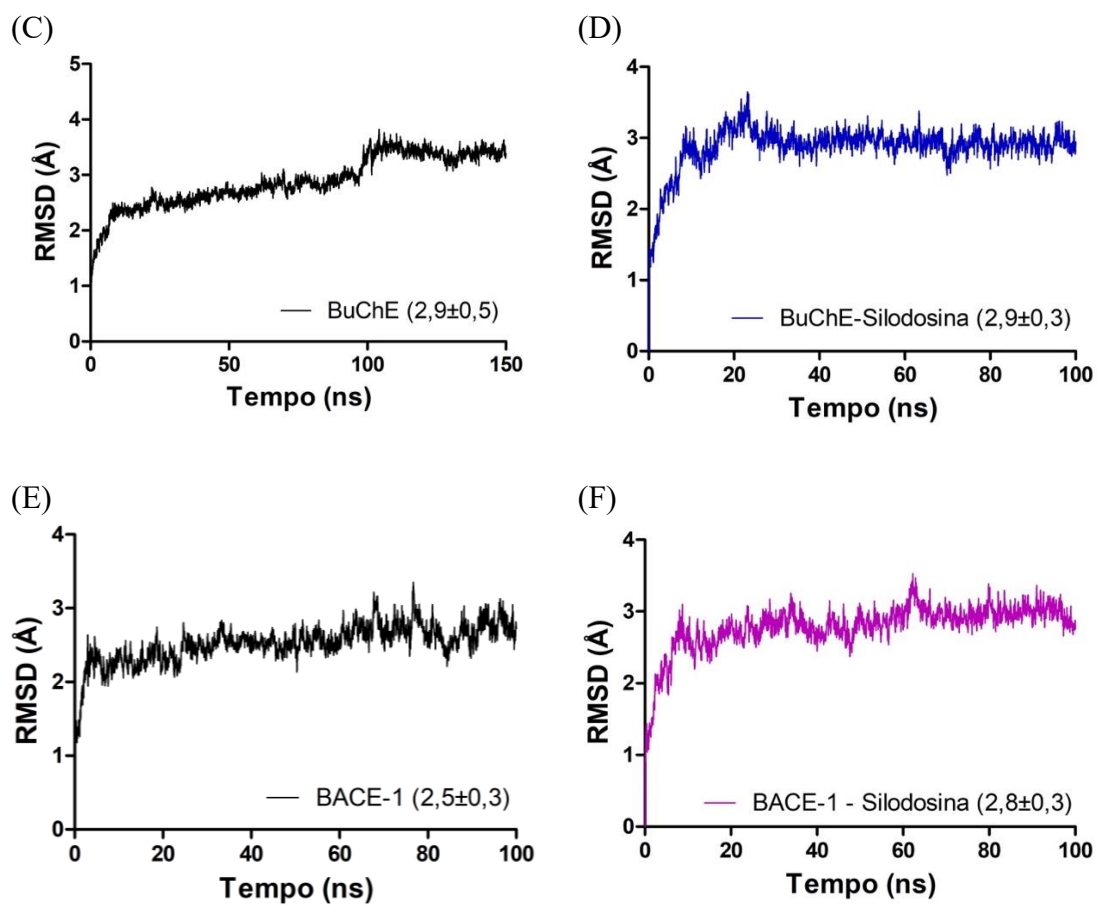
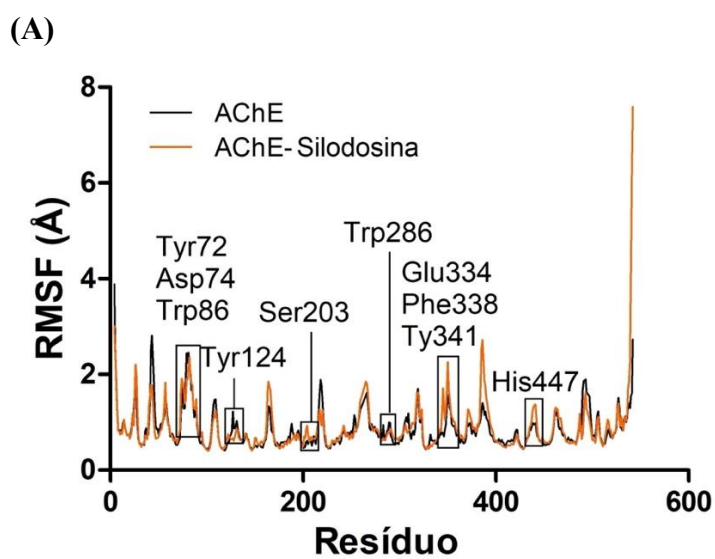
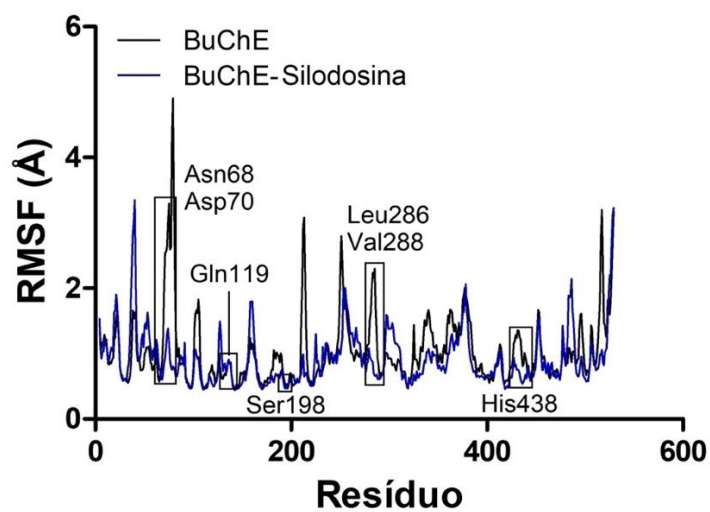


Figura 2



(B)



(C)

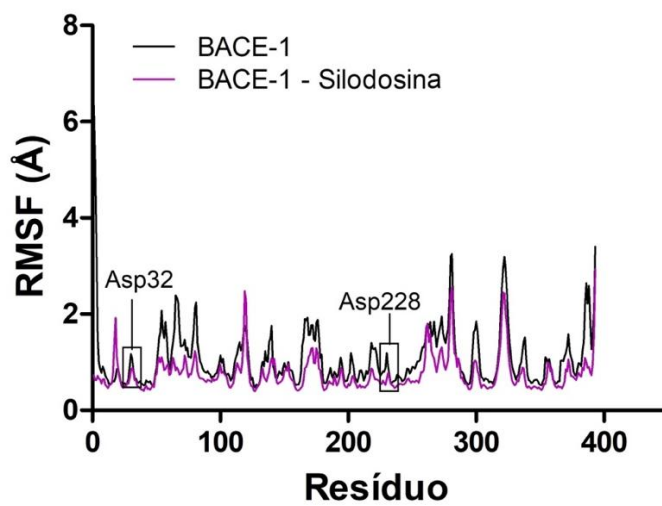


Figura 3

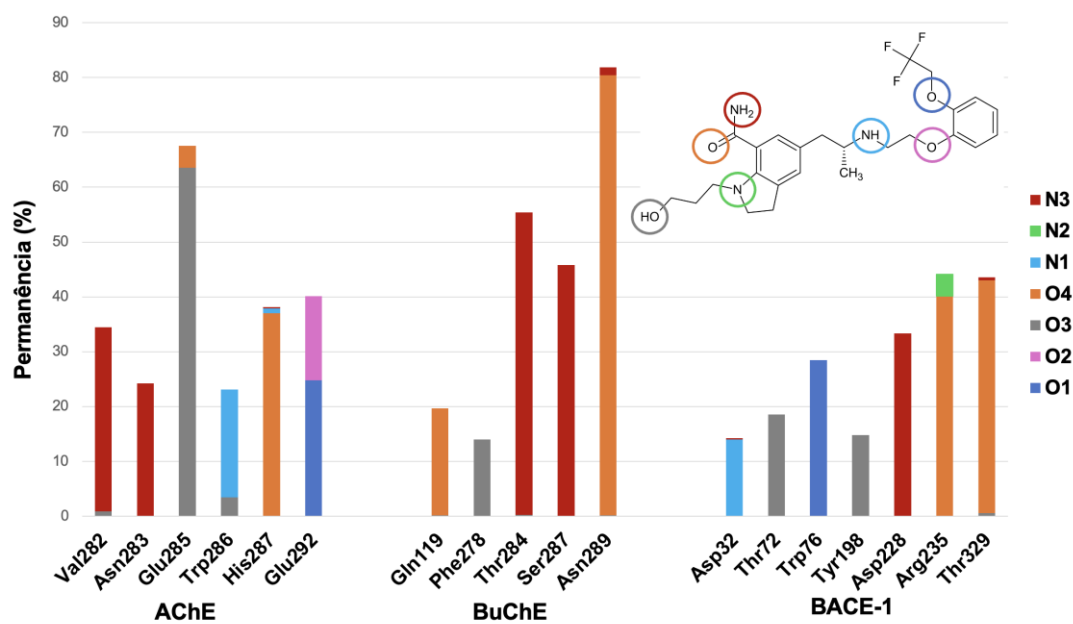


Figura 4

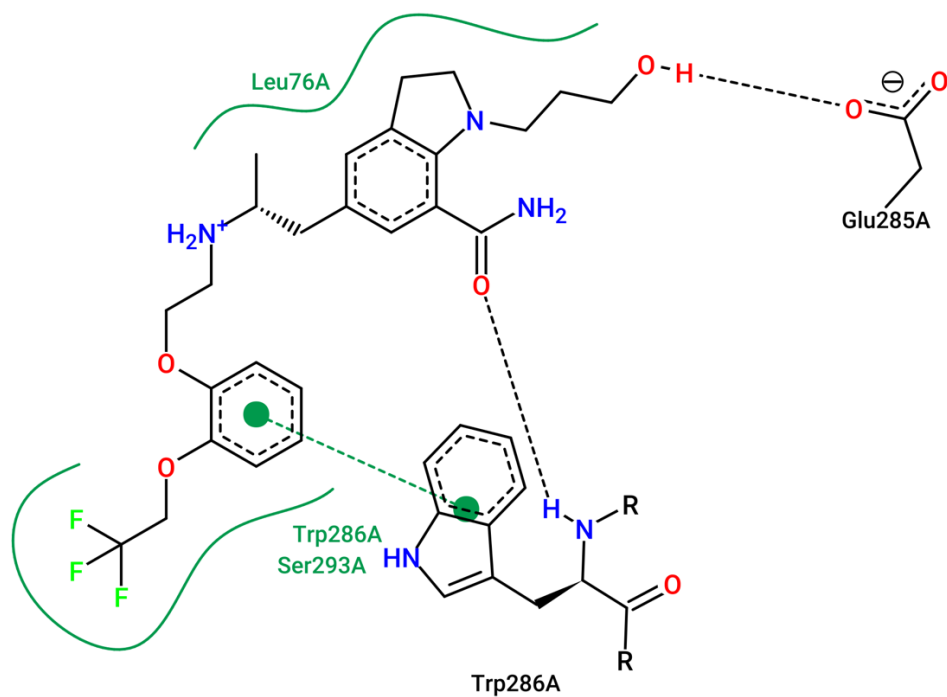
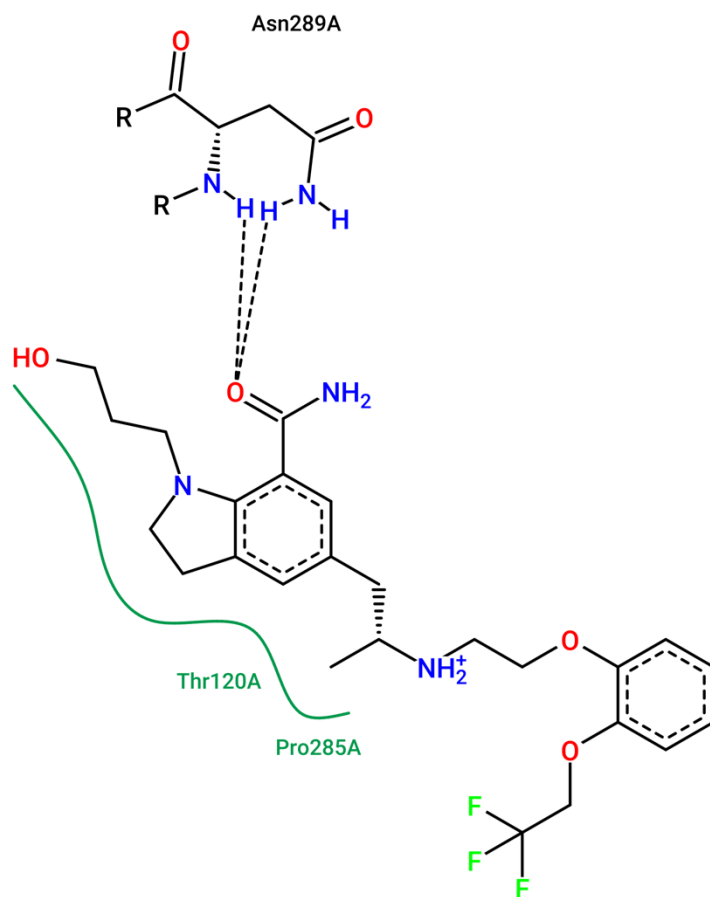


Figura 5

**Figura 6**

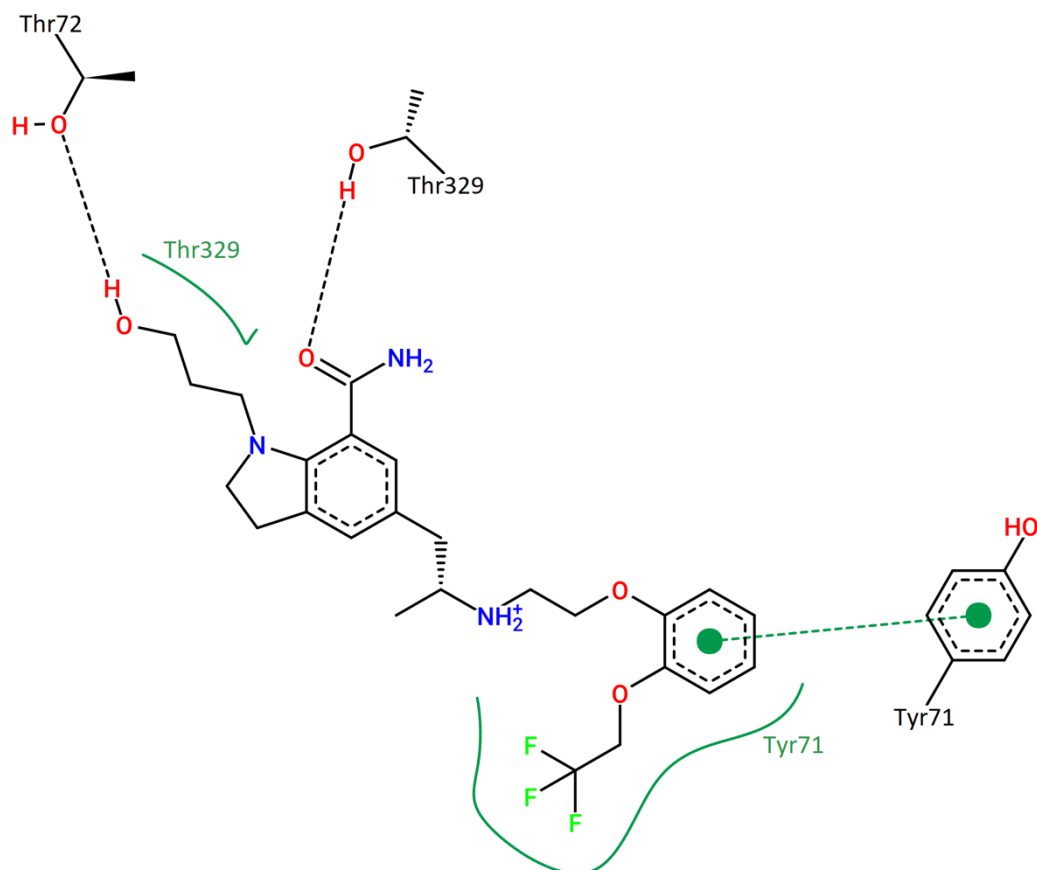


Figura 7

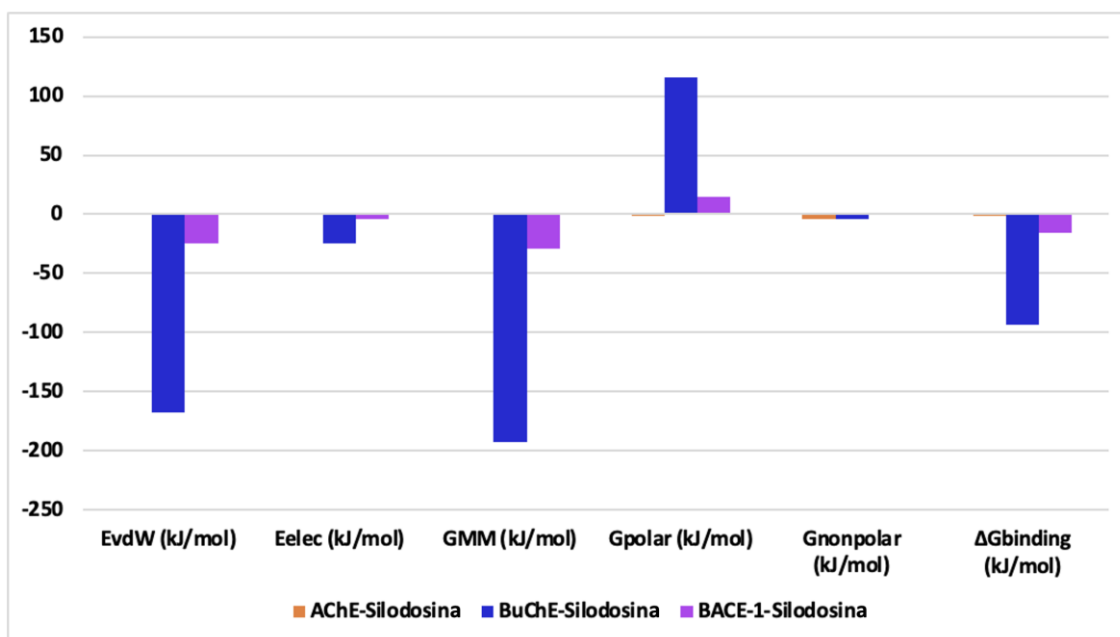
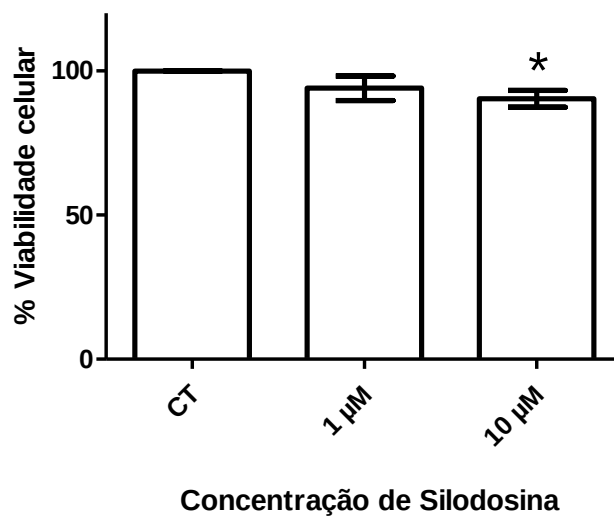
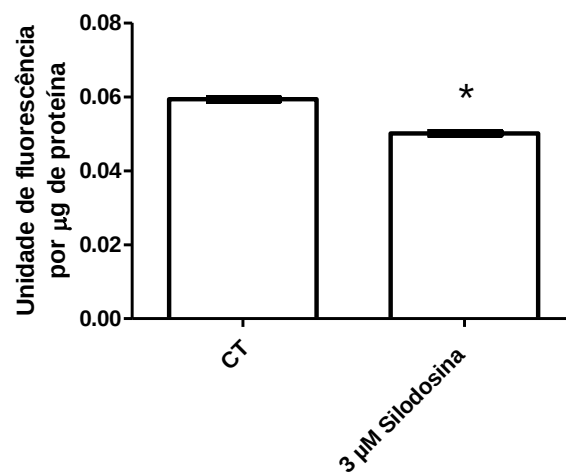


Figura 8

Teste de citotoxicidade - MTT**Figura 9****Atividade de BACE-1
em células PC12****Figura 10**

RESUMO

USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) é, atualmente, um dos principais desafios de saúde pública mundial, caracterizada pelo declínio das habilidades cognitivas individuais. Por ser considerada uma doença multifatorial, o reposicionamento de fármacos que possam atuar diante de vários alvos de maneira concomitante se torna uma estratégia interessante para o tratamento da DA. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o novo uso do medicamento Silodosina como potencial inibidor da acetilcolinesterase (AChE), butilcolinesterase (BuChE) e beta-secretase 1 (BACE-1), principais enzimas envolvidas nas hipóteses de progressão da DA. Nos testes *in vitro*, a Silodosina apresentou boa habilidade de inibição da BuChE ($IC_{50} = 3.02 \mu M$). A concentração $3 \mu M$ também foi capaz de inibir atividade da BACE-1 de células PC12. Além disto, o comportamento molecular desses sistemas através do tempo foi avaliado por Simulação Dinâmica Molecular. Os resultados corroboram com os testes *in vitro*, uma vez que as análises RMSD e RMSF demonstraram que a Silodosina possui características moleculares que permitem a estabilização da AChE, BuChE e BACE-1, apesar da estabilização tardia dos complexos com a enzima AChE. Desta forma, estes resultados sugerem que a Silodosina pode ser útil como fármaco multialvo no tratamento da DA. A presente invenção demonstra o novo uso da Silodosina como inibidor multialvo no tratamento da DA.

PROCURAÇÃO Nº 2 / 2024 - CIE (11.53.03)

Nº do Protocolo: 23062.029636/2024-90

Belo Horizonte-MG, 02 de julho de 2024.

PROCURAÇÃO

Por este instrumento particular de Procuração, o Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, inscrita no CNPJ nº 17.220.203/0001-96, confere poderes especiais à **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI - UFSJ**, inscrita no CNPJ nº 21.186.804/0001-05, com sede na Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, São João del Rei, Minas Gerais, Brasil, neste ato representada por seu Reitor Professor Marcelo Pereira de Andrade, brasileiro, casado, portador da carteira de identidade inscrito no CPF nº 090.451.598-21, para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual face ao pedido de patente intitulado "**USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**", a ser depositado junto ao INPI, para mantê-lo em vigor com amplos poderes para assinar petições e documentos, pagar taxas, anotar transferências, fazer prova de uso da invenção patenteada, apresentar oposições, recursos, réplicas, anotar, elaborar notificações extrajudiciais, e praticar para os fins mencionados todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil e no exterior, em benefício da Outorgante, ratificando os atos já praticados.

(Assinado digitalmente em 02/07/2024 14:36)

CARLA SIMONE CHAMON
DIRETORA-GERAL
CEFET-MG (11.00)
Matrícula: 1218048

Visualize o documento original em <https://sig.cefetmg.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 2, ano: 2024, tipo: **PROCURAÇÃO**, data de emissão: 02/07/2024 e o código de verificação: 06c1930a99



Ministério da Educação

TERMO DE POSSE

O **MINISTRO DE ESTADO DA EDUCAÇÃO**, tendo em vista o disposto no art. 13, da Lei nº 8.112, de 11 de dezembro de 1990, EMPOSSA, nesta data, a servidora **CARLA SIMONE CHAMON**, nomeada pela Portaria MEC nº 1.935, de 20 de outubro de 2023, publicada no Diário Oficial da União de 24 de outubro de 2023, Seção 2, página 18, para exercer o cargo de Diretora-Geral, código CD-2, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais.

A servidora apresentou os documentos exigidos por Lei e prestou o compromisso de fielmente cumprir com os deveres e atribuições do cargo, bem como se comprometeu a observar o Código de Ética Profissional do Servidor Civil do Poder Executivo, aprovado pelo Decreto nº 1.171, de 22 de junho de 1994, anexando a este termo, declaração quanto ao exercício ou não de outro emprego ou função pública.

Para constar, eu, Aline Espíndola Braga, em exercício na Coordenação-Geral de Gestão de Pessoas, lavrei o presente Termo, que vai assinado pelo Ministro de Estado da Educação e pela empossada.

Brasília/DF, 24 de outubro de 2023.


CAMILO SOBREIRA DE SANTANA
Ministro de Estado da Educação


CARLA SIMONE CHAMON



GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA
Universidade Estadual de Feira de Santana
Reitoria - UEFS/REIT

PROCURAÇÃO

Por este instrumento particular de Procuração, a Universidade Estadual de Feira de Santana, inscrita sob o CNPJ nº 14.045.546/0001-73, com sede à Avenida Transnordestina, S/N, Novo Horizonte, Feira de Santana, BA, neste ato representada pela sua representante legal, a reitora Amali de Angelis Mussi, inscrita sob o CPF de nº 076.612.778-83, confere poderes especiais à **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI - UFSJ**, inscrita no CNPJ nº 21.186.804/0001-05, com sede na Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, São João del Rei, Minas Gerais, Brasil, neste ato representada por seu Reitor Professor Marcelo Pereira de Andrade, brasileiro, casado, portador da carteira de identidade inscrito no CPF nº 090.451.598-21, para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual face ao pedido de patente intitulado “**USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**”, a ser depositado junto ao INPI, para mantê-lo em vigor com amplos poderes para assinar petições e documentos, pagar taxas, anotar transferências, fazer prova de uso da invenção patenteada, apresentar oposições, recursos, réplicas, anotar, elaborar notificações extrajudiciais, e praticar para os fins mencionados todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil e no exterior, em benefício da Outorgante, ratificando os atos já praticados.

Feira de Santana, BA, 28 de agosto de 2024.

Amali de Angelis Mussi

Reitora



Documento assinado eletronicamente por **Amali de Angelis Mussi, Reitora**, em 30/08/2024, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://seibahia.ba.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **00097146864** e o código CRC **7E6F2806**.

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Alisson Marques da Silva, CPF 028.636.156-61 ; residente no Rua Júlio Nogueira, 2521, Apto. 102, Divinópolis - MG, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 ALISSON MARQUES DA SILVA
Data: 26/09/2024 12:33:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Eu, DANIEL LUCIANO FALKOSKI, CPF 95303510034; residente na rua Augusto Gali, número 85, bairro Solar da Serra, São João del Rei-MG, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.



Documento assinado digitalmente
DANIEL LUCIANO FALKOSKI
Data: 26/09/2024 14:59:38-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Laila Cristina Moreira Damázio, CPF: 05048335619 residente no ENDEREÇO Rua Milano, 161, Colônia do Marçal, São João del-Rei, Minas Gerais, Cep: 36.302-805 tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 LAILA CRISTINA MOREIRA DAMAZIO
Data: 26/09/2024 11:33:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Tiago Alves de Oliveira, 084997736-30; residente na Rua Neuza Gonçalves de Moares, 10, BL 9, Apto 103, Bairro Marajó, CEP 35501-542, Divinópolis, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.



Documento assinado digitalmente

TIAGO ALVES DE OLIVEIRA

Data: 26/09/2024 14:44:06-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Marcelo Siqueira Valle, CPF 029891386-09; residente na Rua Milano, 161, Colônia do Marçal, São João del-Rei – MG, CEP 36302-805, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 27 de setembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 MARCELO SIQUEIRA VALLE
Data: 27/09/2024 15:31:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Alex Gutterres Taranto, CPF: 77108191687; residente na Rua Dora Bittar Brighenti 118, Solar da Serra. 36302-620, São João del Rei, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.



Documento assinado digitalmente
ALEX GUTTERRES TARANTO
Data: 26/09/2024 14:25:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Deyse Brito Barbosa, CPF 05256972502; residente em Rua Dr. João Mangabeira, 1540, Brasília, Feira de Santana-BA, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.



Documento assinado digitalmente

DEYSE BRITO BARBOSA

Data: 27/09/2024 15:52:18-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Eduardo Habib Bechelane Maia, CPF 047.922.726-88; residente na Rua Inhazinha Epifânio, 131, Apt. 102, Divinópolis – MG, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 27 de Setembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO HABIB BECHELANE MAIA**
Data: 27/09/2024 15:43:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Franco Henrique Andrade Leite, 012.310.455-66; Rua Reginaldo Muritiba do Lago, n. 220, condomínio Quartier, Feira de Santana-BA, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 FRANCO HENRIQUE ANDRADE LEITE
Data: 27/09/2024 10:50:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

GÉSSICA OLIVEIRA MENDES, 057.657.955-60 ; residente na Rua João Mateus de Souza, 96, Centro, Conceição do Coité-BA, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.



Documento assinado digitalmente

GESSICA OLIVEIRA MENDES

Data: 27/09/2024 11:27:45-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Isabella Flores de Souza Marra, CPF: 12644194733; residente na Rua Ministro Amarílio Lopes Salgado, 55, CEP 36033290, Juiz de Fora, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 ISABELLA FLORES DE SOUZA MARRA
Data: 26/09/2024 14:51:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Lorena Silva Matos Andrade, CPF: 026536605-47 ; Rua Dora Bittar Brighenti 118, São João del Rei - MG tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 31 de outubro de 2024.



Documento assinado digitalmente

LORENA SILVA MATOS ANDRADE

Data: 31/10/2024 14:45:31-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVENTOR

TÍTULO DA INVENÇÃO: USO DA SILODOSINA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Eu Michel Pires da Silva, CPF 043.314.816-03 ; residente na Rua Bahia 1401 - AP 101 - CEP 35500-026, Divinópolis-MG, tendo conhecimento do requerimento de patente feito em nome da Universidade Federal de São João del-Rei, em co-titularidade com demais entidades parceiras, com sede à Praça Frei Orlando, nº 170, Centro, CEP 36307-352, inscrita no CNPJ sob o nº 21186804/0001-05, neste ato representada pelo seu Reitor Marcelo Pereira de Andrade, declara que nada tem a opor e dá pleno consentimento a que o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI conceda tal privilégio à aludida Universidade Federal de São João del Rei e as seus cotitulares estabelecidos em contrato.

São João del-Rei, 26 de setembro de 2024.



Documento assinado digitalmente

MICHEL PIRES DA SILVA

Data: 26/09/2024 12:18:28-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura

___ SIAFI2024-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
27/06/24 17:34 USUARIO : LETICIA LONGATT
DATA EMISSAO : 27Jun24 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2024GR800175
UG/GESTAO EMITENTE : 154069 / 15276 - FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE S.J.D
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 154069 GESTAO : 15276
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: JUN24 VENCIMENTO: 23Jul24
DOC. ORIGEM: 154069 / 15276 / 2024NP001234 PROCESSO : 23122.016776/2023
RECURSO : 3
(=) VALOR DOCUMENTO : 70,00
(-) DESCONTO/ABATIMENTO:
(-) OUTRAS DEDUCOES :
(+) MORA/MULTA :
(+) JUROS/ENCARGOS :
(+) OUTROS ACRESCIMOS :
(=) VALOR TOTAL : 70,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409162322211180
CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
PGTO DA TAXA PARA DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE USO DA SILODOSINA PARA O TRATA
MENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER, CONFORME MEMORANDO 1513/2024 SEIPI. N.Nº294091623
LANCADO POR : 07045723628 - LETICIA LONGATT UG : 154069 27Jun2024 12:40
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA



Emitido em 27/06/2024

DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 4163/2024 - SETES (15.00.01.02)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 27/06/2024 17:43)

MARIA LETICIA RODRIGUES LONGATTI

CHEFE DE SETOR - TITULAR

SETES (15.00.01.02)

Matrícula: ###480#0

Visualize o documento original em <https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/> informando seu número: **4163**, ano: **2024**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: **27/06/2024** e o código de verificação: **8fe673e7cb**