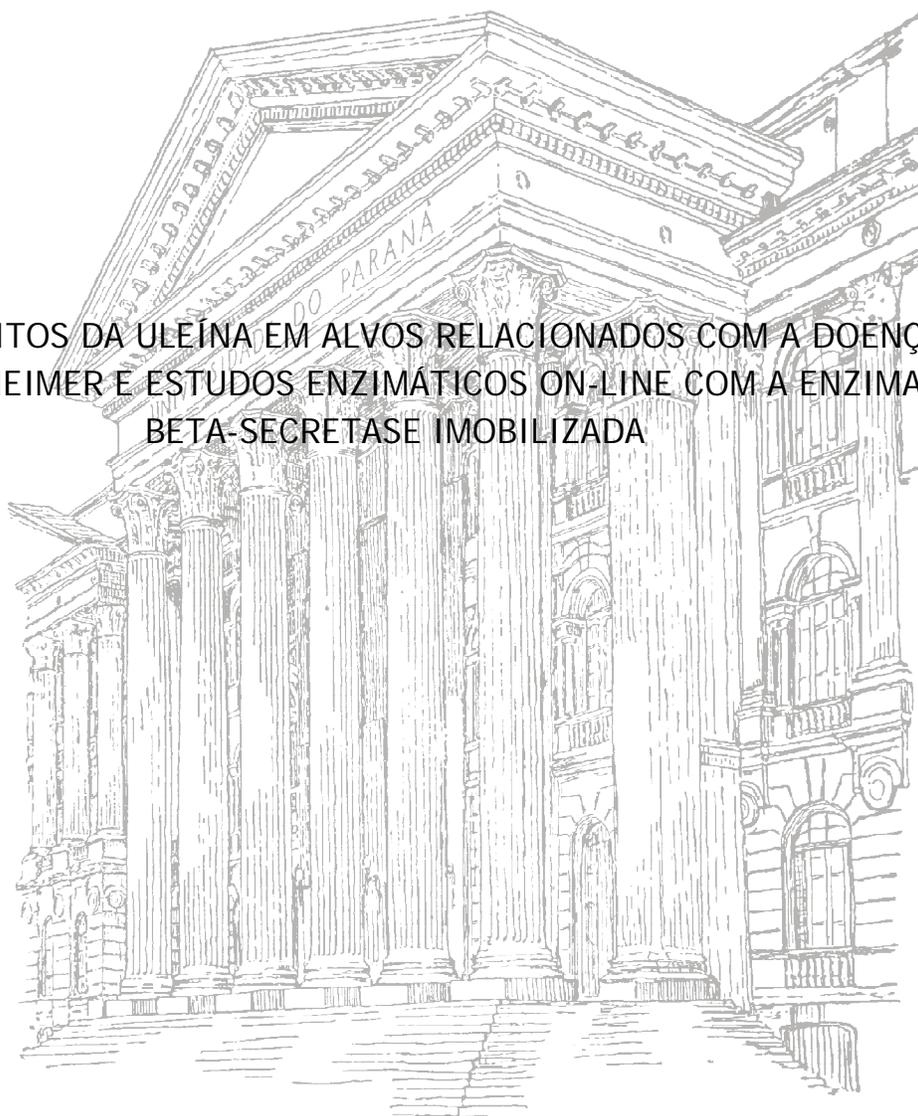


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLÁUDIA SEIDL

EFEITOS DA ULEÍNA EM ALVOS RELACIONADOS COM A DOENÇA
DE ALZHEIMER E ESTUDOS ENZIMÁTICOS ON-LINE COM A ENZIMA
BETA-SECRETASE IMOBILIZADA



CURITIBA

2014

CLÁUDIA SEIDL

EFEITOS DA ULEÍNA EM ALVOS RELACIONADOS COM A DOENÇA
DE ALZHEIMER E ESTUDOS ENZIMÁTICOS ON-LINE COM A ENZIMA
BETA-SECRETASE IMOBILIZADA

Tese submetida em ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, em sistema de co-tutela com o Programa de Doutorado em Química, área de concentração Química Analítica e Farmacêutica do Departamento de Farmácia e Biotecnologia da Universidade de Bolonha, como requisito parcial para obtenção de grau de doutor.

Orientador: Prof. Cid Aimbiré M. Santos
Co-orientadora: Prof. Vincenza Andrisano

CURITIBA

2014

Seidl, Cláudia

Efeitos da uleína em alvos relacionados com a doença de Alzheimer e estudos enzimáticos on-line com a enzima beta-secretase imobilizada / Claudia Seidl. – Curitiba, 2014.

121 f.: il.;30 cm.

Orientador: Cid Aimbiré de Moraes Santos

Co-orientador: Vincenza Andrisano

Dissertação (Doutorado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos em co-tutela com o Departamento de Farmácia e Biotecnologia, Universidade de Bolonha, Área de Química Analítica e Farmacêutica.

Inclui bibliografia

1. Doença de Alzheimer. 2. Acetilcolinesterase 3. butirilcolinesterase. 4. Uleína 5. Beta-secretase I. Santos, Cid Aimbiré Moraes de. II. Andrisano, Vincenza III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.321

DEDICATÓRIA

Para meu pai.

AGRADECIMENTOS

A autora gostaria de agradecer o professor Cid. A.M Santos pelo apoio, dedicação, entusiasmo e paciência durante o desenvolvimento desta tese. Sem o seu apoio e direcionamento este projeto não poderia ter sido realizado. Eu serei eternamente grata por todos os ensinamentos, amizade e acima de tudo pela confiança durante todos esses anos.

Um agradecimento especial para a Dra. Vincenza Andrisano a co-orientadora deste trabalho. Obrigada por me receber sob sua supervisão sem sequer me conhecer e por acreditar no meu potencial. Obrigada por todas as gentilezas, toda a atenção e dedicação. Para mim foi uma experiência inesquecível ter a oportunidade de trabalhar lado a lado com pesquisadores que eu admiro e os quais li tanto sobre o trabalho.

Gostaria de agradecer também a Dra. Manuela Bartolini por todo seu apoio, dedicação e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho. Palavras não podem expressar o quanto aprendi com você.

Para a Dra. Angela de Simone, obrigada por todo seu apoio, constantes conselhos, paciência e amizade durante toda a pesquisa realizada na Itália. Você me ajudou de tantas maneiras durante o meu tempo na Itália tornando os meus dias mais agradáveis exercendo uma grande influência no meu trabalho.

A maior parte do trabalho experimental descrita nesta tese foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Paraná e também no Laboratório de Análise de Fármacos da Universidade de Bologna.

Obrigada a todos os meus colegas em Curitiba e Bologna, em particular a Luma Wosch, Kely Santos, Cristiane Loiva Reichert, Daniele Tedesco e Cecilia Fortugno por proporcionar um ambiente de trabalho agradável e também por todos os momentos de descontração durante o tempo que passamos juntos.

A professora Dra. Almeriane Weffort-Santos, obrigada pela sua amizade e apoio.

Obrigada a Universidade Federal do Paraná, a Universidade de Bologna e a CAPES, particularmente ao programa PDSE pelo apoio financeiro e bolsa de estudos que permitiram a minha permanência no exterior.

Um agradecimento especial para a minha família minha tia, Maria Lúcia, meus primos Daniel e Diana e especialmente à minha mãe por todo amor, apoio e palavras de incentivo quando eu estava me sentindo para baixo e por me ajudarem a acreditar em e insistirem para eu nunca desistir dos meus sonhos.

RESUMO

A doença de Alzheimer, uma doença progressiva, multifatorial, degenerativa do cérebro, é a causa mais comum de demência em idosos. Clinicamente, é caracterizada pela perda de memória progressiva e déficit em diferentes domínios cognitivos associados com a perda de marcadores pré-sinápticos do sistema colinérgico nas áreas do cérebro relacionadas com a memória e aprendizagem e com a presença de depósitos de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares no cérebro de afitos indivíduos. Uma abordagem nova para enfrentar a natureza multifatorial da doença pode ser representada pela descoberta de compostos únicos capazes de modular simultaneamente diferentes alvos envolvidos na cascata neurodegenerativa. Portanto, a capacidade inibitória do alcaloide uleína extraídos da casca do caule da planta medicinal brasileira *Himatanthus lancifolius* Woodson (Müll. Arg.); Apocynaceae contra conhecido alvos validados da doença de Alzheimer, incluindo as enzimas acetilcolinesterase humana, butirilcolinesterase de soro humano, beta-secretase humana e a agregação espontânea do peptídeo beta-amiloide foi realizada resultando em uma atividade inibidora marcante, dentro da gama nanomolar, contra a enzima beta-secretase humana, com um valor de IC_{50} de 180 (\pm 22) nM. Além disso, a uleína foi capaz de inibir ambas as colinesterases com valores de IC_{50} de 279,0 (\pm 4,5) μ M e 24,0 (\pm 1,5) μ M, respectivamente. Finalmente, a uleína também foi capaz de inibir significativamente a agregação espontânea do peptídeo beta-amiloide (40 % na proporção 5:1). Um método cromatográfico rápido, reprodutível e executável com detecção por fluorescência para o ensaio de inibição da enzima beta-secretase recombinante humana utilizando um substrato fluorogênico conhecido como substrato IV foi desenvolvido e aplicado para a avaliação de atividade enzima hrBACE1 imobilizada e sua inibição por um composto natural o qual apresentava propriedades auto-fluorescentes. O método provou ser sensível e permitiu a detecção seletiva do produto de reação enzimática e estudos de inibição.

Palavras-chaves: Doença de Alzheimer, uleína, aceticholinesterase, butirilcolinesterase, beta-secretase, peptídeo beta-amiloide, inibidores de agregação, IMER

ABSTRACT

Alzheimer's disease, a progressive, multifactorial, degenerative disorder of the brain, is the most common cause of dementia among the elderly. It is clinically characterized by loss of memory and progressive deficit in different cognitive domains associated with a loss of the presynaptic markers of the cholinergic system in the brain areas related to memory and learning, and with the presence of amyloid deposits and neurofibrillary tangles in the brain of afflicted individuals. An emerging disease modifying approach to face the multifactorial nature of AD may be represented by the discovery of single compounds which may simultaneously modulate different targets involved in the neurodegenerative AD cascade. Therefore the inhibitory capacity of the indole alkaloid uleine extracted from the stem bark of the Brazilian medicinal plant *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson; Apocynaceae against known Alzheimer's disease validated targets, including human acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase from human serum, human beta-secretase and spontaneous β -amyloid(1-42) aggregation was performed resulting on a remarkable inhibitory activity, within the nanomolar range, against human beta-secretase, with an IC_{50} value of 180 (± 22) nM. In addition, uleine was able to inhibit both cholinesterases showing IC_{50} values of 279.0 (± 4.5) μ M and 24.0 (± 1.5) μ M, respectively. Finally, uleine was also capable of significantly inhibit amyloid self-aggregation (40% at the 5x concentration of β -amyloid(1-42)). In addition, High throughput screening techniques are required for the fast hit inhibitors selection in the early discovery process. However, in inhibitors screening campaign, the most frequently used methoxycoumarin based peptide substrate (M-2420) is not widely applicable when aromatic or heterocyclic compounds of natural source show auto-fluorescence interferences. Here, in order to overcome these drawbacks, we propose the use of a highly selective 4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid/5-[(2-aminoethyl)amino]naphthalene-1-sulfonic acid based peptide substrate (Substrate IV), whose cleavage product is devoid of spectroscopic interference. The human beta-secretase immobilized enzyme reactor was prepared and characterized in terms of units of immobilized of beta-secretase. Substrate IV cleavage was kinetically characterized on-line in terms of K_M and v_{max} , in a classical Michaelis and Menten study. The online kinetic constants were found consistent with those obtained with the in solution standard method. In order to further validate the use of Substrate IV for inhibition studies, the inhibitory potency of a well-known beta-secretase peptide inhibitor was determined. A further application with uleine as BACE1 inhibitor was carried out to prove the system suitability for natural compounds.

Keywords: Alzheimer's disease, uleine, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, β -secretase, amyloid- β peptide, inhibitors, aggregation, IMER

NOTA BIBLIOGRÁFICA

A autora formou-se em Farmácia Industrial pela Universidade Federal do Paraná em 2007. Durante sua graduação, foi aluna de iniciação científica de agosto de 2006 a julho de 2007 no Laboratório de Farmacognosia. Em março de 2008 entrou para o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR obtendo o grau de mestre em 2010 com o projeto intitulado "Estudo da atividade anticolinesterase plantas medicinais". Desde maio de 2010 a autora trabalha com a linha de pesquisas sobre o efeito de produtos naturais em alvos-chaves relacionados com a doença de Alzheimer e estudos enzimáticos enzimas imobilizadas em suportes cromatográficos sob a supervisão do Prof Cid Aimbiré de Moraes Santos. De setembro de 2011 a setembro de 2012, a autora realizou um estágio de doutorado no exterior (PDSE Programa CAPES) no Laboratório de Análise de Fármacos na Alma Mater Studiorum Universidade de Bolonha, Itália, sob a supervisão da Prof Vincenza Andrisano. Neste período, foi convidada para participar do Programa de Pós-Graduação em Química, em regime de co-tutela. Os resultados destes estudos presentes nesta tese e foram, em parte, publicada em:

De Simone, A., Seidl, C., Santos, C.A.M., Andrisano, V., 2014. Liquid chromatographic enzymatic studies with on-line Beta-secretase immobilized enzyme reactor and 4-(4-dimethylaminophenylazo) benzoic acid/5-[(2-aminoethyl) amino] naphthalene-1-sulfonic acid peptide as fluorogenic substrate. J. Chromatogr. B 953-954C, 108-114.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação gráfica de alguns dos eventos multifatoriais que levam a morte neuronal na DA.	18
FIGURA 2. Patogêneses da Doença de Alzheimer	19
FIGURA 3. Disfunção sináptica da Doença de Alzheimer.....	21
FIGURA 4. Via amioidogênica da proteína precursora amiloide (APP).....	24
FIGURA 5. A clivagem da APP	25
FIGURA 6. Principais eventos intracelulares que contribuem para a morte celular na doença de Alzheimer.	26
FIGURA 7. Disco EDA-CIM [®] e seu invólucro.....	56
FIGURA 8. Princípios do ensaio de transferência de.....	57
FIGURA 9. Atividade inibitória da uleína contra as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase	79
FIGURE 10. Michaelis-Menten e estado de inibição estacionário da eelAChE pela uleína.....	83
FIGURA 11. Espectro de emissão de fluorescência sobrepostos ($\lambda_{exc}=320$ nm) do produto da hidrólise enzimática do substrato M2420 pela BACE1 e a solução uleína (0.05 mM) ..	88
FIGURA 12. Varredura por tempo da agregação espontânea do A β 42 (50 mM) na ausência (linha superior) e na presença (linha inferior) de uleína (250 mM).....	92
FIGURA 13. Cromatograma do produto de hidrólise (MCA) obtido pela injeção de concentrações crescentes do substrato M-2420 no hrBACE1-IMER.	101
FIGURA 14. Cromatograma do produto de hidrólise MCA obtido pela injeção de soluções de concentrações crescentes de MCA no EDA-CIM [®] disk sem a enzima.	102
FIGURA 15. Michaelis-Menten obtido pela análise hrBACE1-IMER acoplada ao sistema CLAE com detecção por fluorescência (320/420) do produto MCA e do M-2420	103
FIGURA 16. Os cromatogramas sobrepostos foram obtidos com a injeção de fragment fluorogênico 1,5-EDAN, substrato IV em duas concentrações e DMSO ao hrBACE1-IMER	106
FIGURA 17. Cromatogramas sobrepostos relativos à injeção do produto de hidrólise do substrato IV, 1,5-EDANS no disco EDA-CIM [®]	106
FIGURA 18. Os cromatogramas sobrepostos relativos às injeções de concentrações crescentes de Substrato IV no hrBACE1-IMER.....	107

FIGURA 19. Parâmetros de regressão linear foram obtidos pela comparação da área do produto de hidrólise de M-2420 e do substrato IV na presença e na ausência de concentrações crescentes de inibidor..... 109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Inibição da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase pela uleína	78
TABELA 2- Inibição da BACE1 e da agregação espontânea do A β 42 pela uleína e composto de referência.....	89
TABELA 3 – Parâmetros cinéticos da clivagem do substrato M-2420 pela hrBACE1 em solução e imobilizada.....	103
TABELA 4 - Kinetics Parâmetros cinéticos da clivagem do substrato IV pela hrBACE1 em solução e imobilizada.....	107
TABELA 5 - Parâmetros cinéticos da clivagem do substrato IV e do M-2420 pelo hrBACE1-IMER.....	108
TABELA 6 – Valore de IC ₅₀ para o nibitor IV obtidos pelo ensaio FRET em solução e com o hrBACE1-IMER com os dois substratos (M-2420 e substrate IV).....	110

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. Reação de Ellman utilizando a acetilcolina e a acetilcolinesterase	77
ESQUEMA 2. Procedimento de imobiliação da enzuma hrBACE1 no disco EDA-CIM	99

ABBREVIATION LIST

DA – Doença de Alzheimer
A β - peptídeo beta amiloide
ACh – colinesterase
AChE – acetilcolinesterase
APP – proteína precursora amiloide
ATCh – acetiltiocholine
BACE1 – enzima 1 de clivagem do sítio-beta da APP
BACE2 – enzima 2 de clivagem do sítio-beta da APP
BChE – butirilcolinesterase
BTCh – butiriltiocholine
CHAPS – (3-[(3-holamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfonato
ChAT – colina acetiltransferase
ChEI – inibidor da colinesterase
CIM – meio de interação convectiva
SNC – sistema nervoso central
DMSO – dimethylsulfoxido
DTNB – ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EDA – ethilenodiamina
EeAChE – acetilcolinesterase de peixe elétrico
FAD – doença de Alzheimer tipo familiar
FRET – transferência de energia ressonante de fluorescência
HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfônico
HIFP – 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
hrAChE – acetilcolinesterase recobinante humana
hrBACE – beta-secretase recombinante humana
IMER – reator de enzima imobilizada
K_i – constante de inibição
K_m – constante de Michaelis-Menten
mAChR- receptor muscarínico de acetilcolina
MAO – monoamina oxidase
MTDL – ligantes direcionados multi-alvos
nAChR – receptor nicotínico de acetilcolina
NFT – emaranhados neurofibrilares
NMDA – N-methyl-D-aspartato
PAS – sítio periférico aniônico
PSEN1 – presenilina 1
PSEN2 – presenilina 2
SAD- doença de Alzheimer tipo esporádica
sAPPa- proteína a precursora amiloide solúvel
sAPPb - proteína b precursora amiloide solúvel
ThT – tioflavina T
V_{max} – velocidade máxima

Sumário

1. Introdução	14
2. Estado da arte	16
2.1. A doença de Alzheimer	16
2.2 Principais característica da Doença de Alzheimer	21
2.2.1.A falha na comunicação neuronal e a hipótese colinérgica	21
2.2.2.Placas amiloides e a hipótese da cascata amiloide	23
2.2.3.Emaranhados neurofibrilares e a hipótese da hiperfosforilação	26
2.3 Tratamentos disponíveis para a DA	28
2.3.1. Inibidores colinesterásicos	28
2.3.2. Antagonistas dos receptores de glutamato NMDA	31
2.4. Novas terapias	32
2.4.1. A hipótese da cascata amiloide	32
2.4.2. Inibidores da secretase	33
2.4.3. Substâncias anti-agregação amiloide	36
2.4.4. Inibidores das colinesterases	37
2.4.5. Drogas com efeitos multi-alvos	38
2.5. Produtos naturais e a doença de Alzheimer	41
2.5.1. Os alcaloides e a doença de Alzheimer	42
2.5.2. Alcaloides como inibidores das enzimas colinesterases	44
2.5.2.1 Alcaloides indólicos como inibidores da acetilcolinesterase	48
2.5.3. Alcaloides como inibidores das secretases	49
2.5.4. Alcaloides promovendo anti-agregação e eliminação	50

2.5.5. Uleína	52
2.6. Ensaio enzimáticos	53
3. Justificativa	60
4. Objetivos.....	61
5. Parte experimental.....	62
5.1 Reagentes e solventes	62
5.3. Material vegetal.....	63
5.3.1.Extração, isolamento e identificação da uleína.....	64
5.4. Ensaio em solução.....	64
5.4.1.Ensaio de inibição com as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.....	64
5.4.2.Análise cinética da inibição da enzima acetilcolinesterase de peixe elétrico pela uleína.....	66
5.4.3.Ensaio de inibição da enzima beta-secretase.....	66
5.4.4.Ensaio da inibição da agregação espontânea do peptídeo beta-amiloide (1-42)	68
5.4.5.hrBACE1 Michaelis-Menten com os substratos M-2420 e Substrato IV em solução	69
5.5 Ensaio com a enzima hrBACE1 imobilizada	71
5.5.1. Imobilização da enzima hrBACE1.....	71
5.5.3 Otimização das condições cromatográficas.....	72
5.5.3.1. pH da fase móvel	72
5.5.3.2. Fluxo	72
5.5.4. Estabilidade do hrBACE1-IMER.....	73
5.5.5. hrBACE1-IMER Michaelis-Menten para o substrato M-2420	73
5.5.6 hrBACE1-IMER Michaelis-Menten para o substrato IV	74
5.5.7. Ensaio de inibição no hrBACE1-IMER.....	75

5.5.8. IC ₅₀ da uleína no hrBACE1-IMER	76
6. Resultados e discussão	78
6.2. Inibição da AChE e BChE pela uleína	78
6.2. Avaliação cinética da inibição da enzima eelAChE pela uleína.....	84
6.3. Inibição da β - secretase pela uleína.....	86
6.4. Inibição da agregação espontânea do peptídeo beta-amiloide.....	93
6.5. Efeitos simultâneos em múltiplos alvos relacionados com a DA.....	96
6.6. Ensaio com a enzima hrBACE1 imobilizada.....	97
6.6.1. Imobilização da hrBACE1.....	100
6.5.2. Rendimento da imobilização.....	102
6.5.3. Determinação da atividade do hrBACE1-IMER	102
6.5.4 Determinação do número de enzimas imobilizadas ativamente hrBACE1-IMER.....	103
6.5.5. Caracterização do hrBACE-IMER pelo Substrate IV.....	105
6.5.6. Ensaio de inibição no hrBACE1-IMER.....	110
7. Conclusão e trabalhos futuros	112
8. Referências	113

1. Introdução

O advento de tecnologias modernas e o desenvolvimento de novos caminhos em medicina e na ciência dobrou a expectativa de vida em apenas 100 anos, especialmente nos países desenvolvidos, como resultado de uma melhoria drástica na qualidade de vida. A doença de Alzheimer (DA) é uma das formas mais comuns de doenças neurodegenerativas em pessoas com mais de 65 anos de idade afetando cerca de 10% das pessoas acima desta idade e cerca de 50% acima de 85 anos (Orhan et al., 2006; Racchi et al., 2004; Reichman, 2003; Viegas et al., 2005).

Na Conferência Internacional: "Tomorrow's People? The Challenges of Technologies for Life Extension and Enhancement", realizada em 2006, na Inglaterra, um dos palestrantes, informou que a média de vida vai chegar a 120 anos de idade até o ano de 2066, o que sugere um aumento dramático no número de população idosa no futuro. Isso se traduz em um aumento dramático no número de pacientes idosos que sofrem de distúrbios senis incluindo doenças neurodegenerativas (Park, 2010).

A DA é caracterizado pela morte das células nervosas no córtex cerebral sendo o subtipo mais comum de demência afetando 25 milhões de pessoas em todo o mundo em 2000 com um esperado aumento para 114 milhões em 2050. Apesar do crescimento exponencial do número de pacientes com a DA, somente a acetilcolinesterase (AChE) e inibidores um agonista do receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) são usados atualmente para tratar a DA. No entanto, é bem conhecido que estes agentes terapêuticos só pode aliviar os sintomas da doença de Alzheimer, mas não são capazes de interromper a progressão da doença. A DA é de fato um transtorno complexo resultante de múltiplos anormalidades moleculares, e não de um defeito em um alvo ou gene único. Embora grande ganho em conhecimento básico da ciência tenha sido feito com relação ao desencadeamento da DA e a sua evolução, estes ainda não resultaram em drogas clinicamente eficazes capazes de modificar o percurso da doença.

Desde que Alois Alzheimer descreveu a DA pela primeira vez, muitas pesquisas vem sendo realizadas a fim de esclarecer a patogênese da doença. No entanto, a DA ainda representa um dos maiores desafios médico em nossos dias dentro da população idosa em países desenvolvidos. O lançamento no mercado dos inibidores da AChE tem proporcionado alívio sintomático em pacientes com a DA do nível leve a moderado. Mais recentemente, a memantina, como um antagonista do receptor de NMDA, foi introduzida na prática clínica para o tratamento da DA de nível moderado a grave. No presente, a pesquisa está focada em novos alvos biológicos fortemente ligados a patogênese desta doença, principalmente relacionados com a degeneração neuronal, placas neuríticas que contenham o peptídeo beta amiloide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares. No entanto, há uma imensa necessidade de estudos mais bem desenhados sobre novos medicamento ou terapias combinadas para o que surja um tratamento eficaz da DA.

2. Estado da arte

2.1. A doença de Alzheimer

Quando Aloïs Alzheimer tratou a paciente August D. mais de 100 anos atrás, ele não sabia que ele estava prestes a descrever uma das doenças mais complexas e desafiadoras na história da humanidade (Marco-Contelles et al., 2013). Em novembro de 1901, Aloïs Alzheimer examinou uma paciente que havia sido internada no dia anterior no Asilo de Alienados e Epilepsia em Frankfurt, Alemanha. Auguste D., 51 anos de idade, esposa de um funcionário da estrada de ferro, tinha história de vários meses de paranoia, distúrbio de memória e incapacidade de realizar tarefas domésticas. Durante a anamnese, ela estava desorientada e com memória de curto prazo severamente prejudicada. Suas respostas às perguntas mostraram perseverança, confabulação e erros paráfrase, e seus esforços para utilizar objetos do cotidiano eram apráxicos. No entanto, os nervos cranianos, função motora e sensorial, coordenação, reflexos e marcha foram normais. Alzheimer concluiu que a idade do seu paciente era incompatível com demência senil e que nem a história nem exame forneceram evidências para paralisia geral devido à neurosífilis (Greenberg and Jin, 2006).

Quando August D. morreu cinco anos mais tarde, Alzheimer obteve seu cérebro. Na análise macroscópica, apresentou-se encolhido, mas as descobertas mais interessantes foram encontradas durante o exame microscópico. Em secções coradas com prata, Alzheimer observou feixes intraneuronais anormais de neurofibrilas, bem como depósitos extracelulares não corados de composição desconhecida. Estas características histológicas, agora denominadas emaranhados neurofibrilares e placas senis ou amiloides, ajudaram a definir uma nova entidade de diagnóstico, demência pré-senil, mais tarde chamada doença de Alzheimer (Greenberg and Jin, 2006).

A doença pode ser clinicamente descrita por três fases progressivas. No início, os neurônios do sistema límbico são atacados, particularmente aqueles do hipocampo que são a zona de memória do cérebro. Além disso, apenas os neurônios colinérgicos são afetados, como se a doença selecionasse particularmente os neurônios de memória. Na primeira fase da doença, o hipocampo diminui em volume, cerca de 25%. Uma vez que os neurônios da zona responsável pela ligação entre a memória de curto prazo e memória de longo prazo estão parcialmente danificados, a pessoa que está nesta fase prematura da doença diminuiu ligeiramente a capacidade de memorização. A pessoa pode de fato mostrar alguns pequenos sinais de esquecimento, em relação, por exemplo, a nomes ou eventos recentes. As pessoas afetadas também podem experimentar pequenas dificuldades em se comunicar e adquirir novas informações. O estágio prematuro geralmente dura de dois a quatro anos. Em segundo lugar, a fase intermédia, que é a mais longa e pode durar de dois a dez anos, tem início. A doença continua a causar devastação particularmente no sistema límbico. O hipocampo continua a perder seus neurônios e várias outras zonas do sistema límbico agora estão danificadas. A pessoa perde a memória de curto prazo e, conseqüentemente, tem dificuldades em se comunicar. Em seguida, há uma diminuição marcada nos níveis de acetilcolina de certos neurônios, entre os quais estão os do telencéfalo ventral, os quais, em condições normais, estão envolvidos na armazenagem de informação da memória de longo prazo. A pessoa, portanto, não consegue lembrar nenhuma informação mais nova, ou seja, memória de curto prazo fica danificada. Durante esta fase, a pessoa também pode sofrer alterações de personalidade, confusão, raiva, tristeza e falta de concentração e orientação. Na terceira e última fase da doença já devastou uma grande parte do sistema límbico, incluindo 90 % do hipocampo. Durante a fase avançada da doença, quase nenhuma recuperação de informação é possível por causa dos danos ao sistema límbico. Neste ponto, a doença agora ataca neurônios colinérgicos em todo o córtex cerebral, destruindo, assim, as memórias ali armazenadas. A pessoa, então, se esquece de seu passado, amigos e

familiares. Além disso, perde também a memória ocasional e perde totalmente qualquer capacidade de comunicar ou para trabalhar. Esta fase tem duração de um a três anos, em média, e termina com a morte da pessoa por complicações relacionadas com a doença (Pallas and Camins, 2006).

A etiologia da AD ainda não foi completamente elucidada, mas há evidências de que esta doença neurodegenerativa é uma síndrome multifatorial, resultante de um conjunto complexo de fatores neuroquímicos. Ambos os estudos genéticos humanos e em modelos animais transgênicos da DA sugerem que vários eventos desencadeiam um caminho patológico convergente levando ao mau funcionamento e morte celular (Bolognesi et al., 2009c).

Qualquer que seja a sua causa, a DA, desde a sua descoberta foi caracterizada pela presença de três principais características do cérebro: (i) difusa perda neuronal com um envolvimento específico do sistema colinérgico, (ii) os depósitos de proteínas intracelulares denominadas emaranhados neurofibrilares, e (iii) depósitos de proteínas extracelulares conhecidos como depósitos amiloides ou placas senis. Estas lesões patológicas foram interpretadas como características causadoras, fornecendo a base para as principais teorias relativas à patogênese da DA, tais como a hipótese colinérgica (Bartus et al., 1985), a hipótese da cascata amiloide (Hardy and Higgins, 1992) e a hipótese da hiperfosforilação (Small and Duff, 2008). Com os avanços constantes do mecanismo básico que levam a neurodegeneração, essas teorias foram integradas a outras, proporcionando um cenário patogênico complicado. Estresse oxidativo e formação de radicais livres, desosmeostase de metais, disfunção mitocondrial, a inflamação, as "lipid rafts" de colesterol, e fatores vasculares foram identificados ao longo dos anos como intervenientes ativos na fisiopatologia da DA (Bolognesi et al., 2009c).

Uma representação gráfica dos principais eventos multifatoriais relacionados com o aparecimento da DA podem ser observados nas Figuras 1 e 2.

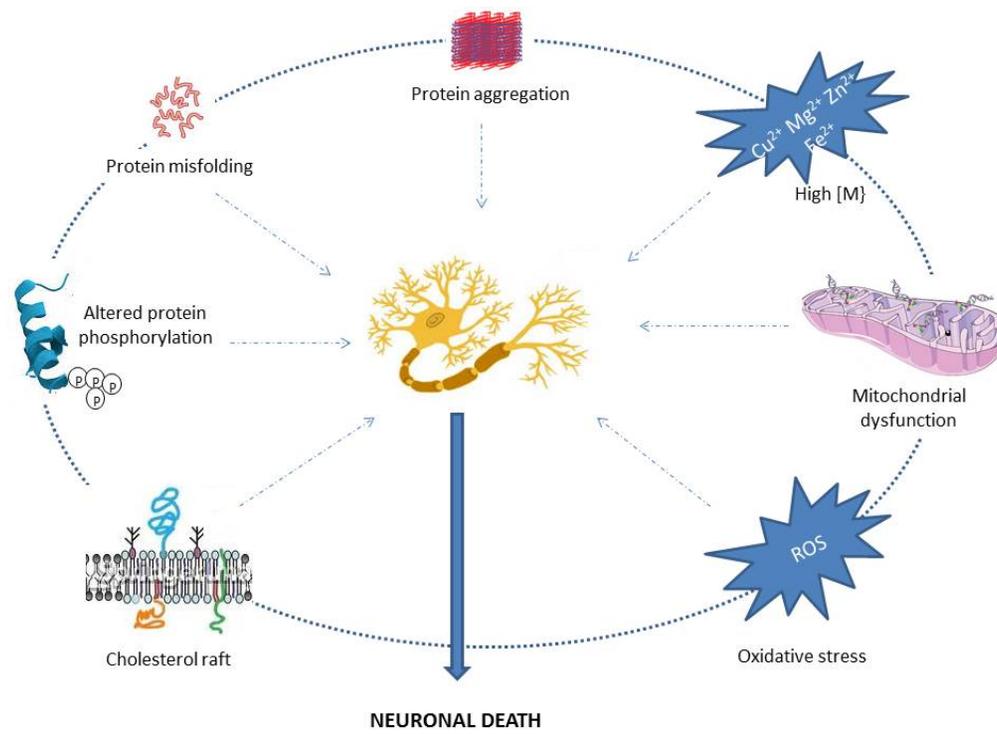


Figura 1. Representação gráfica de alguns dos eventos multifatoriais que levam à morte celular na DA.

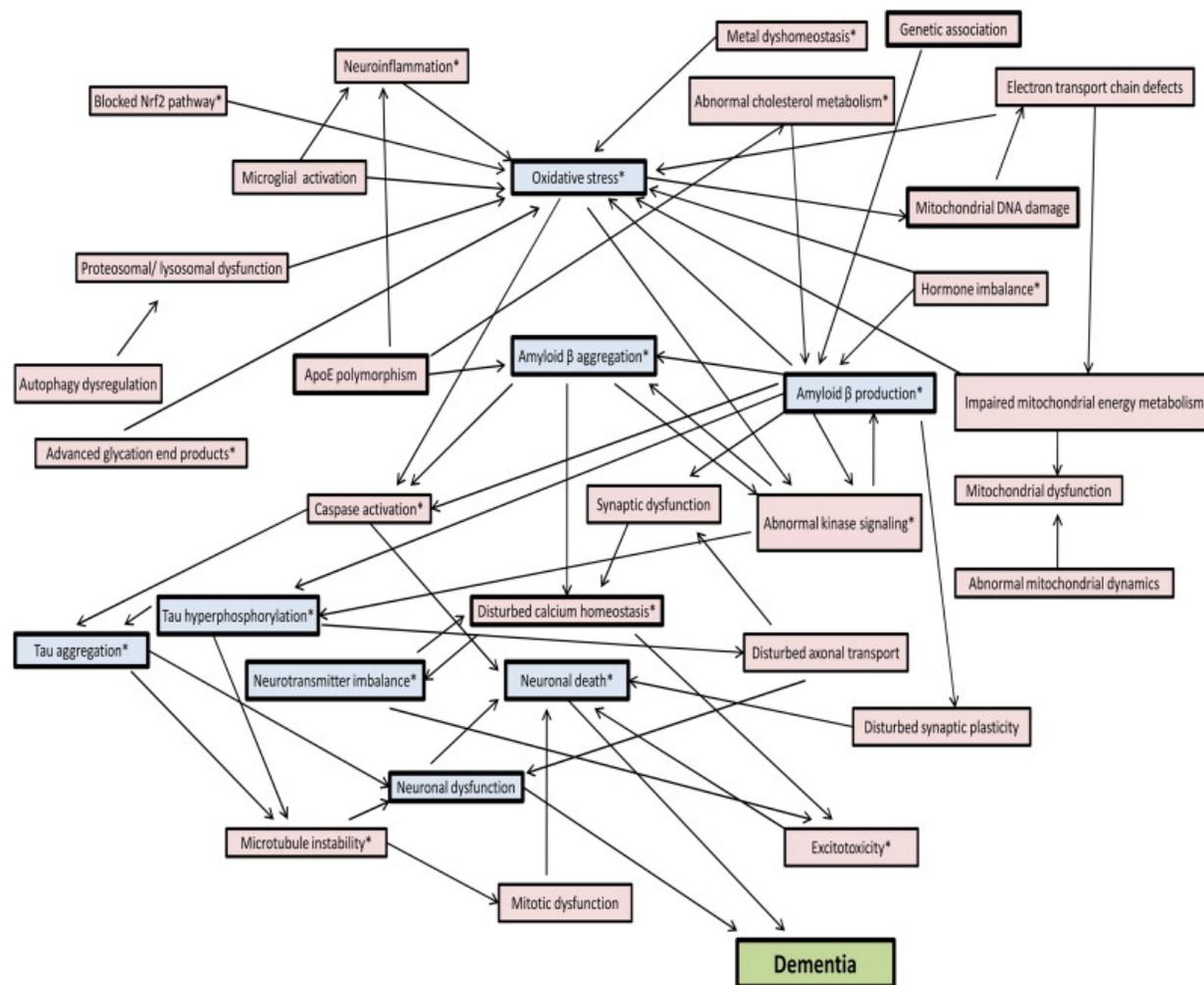


Figura 2. Patogênese da Doença de Alzheimer – A figura demonstra que vários mecanismos estão envolvidos na patogênese da Doença de Alzheimer. Os principais mecanismos estão em caixas de texto em negrito. * Indica os mecanismos alvos para estratégias terapêuticas (Anand et al., 2014).

2.2 Principais característica da Doença de Alzheimer

2.2.1. A falha na comunicação neuronal e a hipótese colinérgica

A doença de Alzheimer primariamente pode ser definida como uma desordem na comunicação neuronal. O número de sinapses no hipocampo começa a diminuir em pacientes com prejuízo cognitivo leve (um estado de déficit cognitivo limitado geralmente precedente a demência). Com o avanço da doença, a perda das sinapses se torna desproporcional comparado ao número de neurônios, e essa perda é a melhor correlação com a demência (Querfurth and LaFerla, 2010).

Um número variado de estudos em humanos indica que os sistemas colinérgicos basais possuem papéis importantes na consciência, atenção, memória de trabalho e um número adicional de processos mnemônicos (Perry et al., 1999).

Por mais de 20 anos, estudos do cérebro daqueles acometidos com Alzheimer em estágio avançado encontraram sistematicamente danos ou anormalidades neste sistema o que parecia correlacionar bem com os níveis de declínio cognitivo. Na autópsia, é possível perceber no cérebro com DA uma marcada perda de neurônios e sinapses em diversas áreas do SNC, especialmente em regiões envolvendo funções cognitivas de ordem elevada, como o hipocampo e o córtex associado. Além disso, existe uma redução global e dramática dos níveis de neurotransmissores, dentre os quais a ACh é o mais importante, sendo quase com certeza a causa das manifestações clínicas da DA: perda de memória, alucinações, paranoia, agitação e depressão (Figura 3) (Piazzini et al., 2007a).

Como resultado, a denominada "hipótese colinérgica" foi postulada. Esta hipótese preconiza essencialmente que a perda de funções colinérgicas no SNC contribui significativamente para o declínio cognitivo associado com o avanço da DA (revisado, em (Bartus, 2000)). Uma vasta literatura baseada em experimentos em animais sustenta os

dados em humanos. De fato, a importância da hipótese colinérgica para o aprendizado e memória foi reconhecida mais de 30 anos atrás após a descoberta de que agentes antimuscarínicos levam a perda de memória em ratos (Deutsch, 1971).

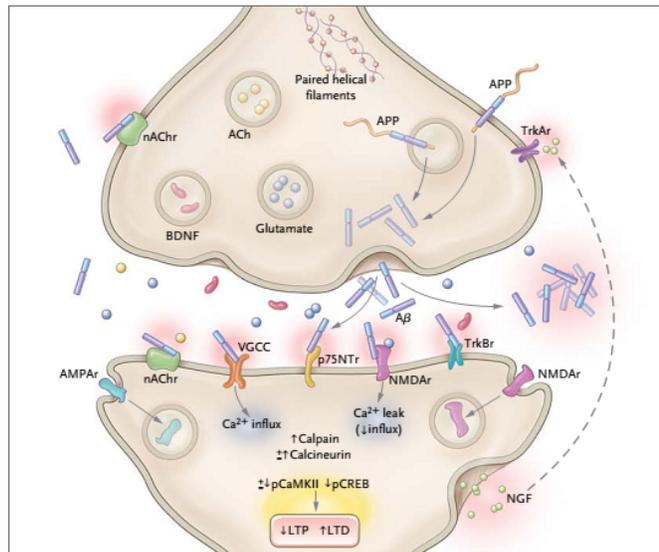


Figura 3. Disfunção sináptica na doença de Alzheimer. A perda sináptica correlaciona melhor com o declínio cognitivo na doença de Alzheimer. Uma sinapse normal é mostrada no topo da figura. Na parte inferior da figura, uma "sinapse doença de Alzheimer" que descreve os efeitos pleiotrópicos do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) é mostrado. Anéis representam vesículas sinápticas. Aplicação experimental e expressão de $A\beta$, em especial oligômeros, prejudicam a plasticidade sináptica, alterando o equilíbrio entre a potenciação de longo prazo e depressão a longo prazo reduzindo o número de espinhas dendríticas. Em concentrações elevadas, os oligômeros podem suprimir a transmissão sináptica basal. $A\beta$ facilita endocitose dos receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDAr) e ácido propiônico-5-metil-4-isoxazole α -amino-3-hidroxi. $A\beta$ também se liga aos receptores de neurotrofina p75 e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, também conhecido como o receptor tirosina-quinase B [trkBr]), exacerbando uma situação em que os níveis de BDNF e do fator de crescimento do nervo (NGF) já são suprimidos. $A\beta$ prejudica receptor nicotínico de acetilcolina (ACh) (nAChR) no terminal pré-sináptico. O número de sinapses do hipocampo diminui ocasionando no cognitivo leve e as sinapses restantes mostram aumentos compensatórios de tamanho. APP conhecida como proteína precursora amiloide, pCaMKII fosforilada cálcio dependente de calmodulina proteína quinase 2, pCREB fosforilada cíclica resposta-vinculativo elemento proteína AMP, trkAr tirosina quinase A receptor, e de canais de cálcio voltagem- VGCC (Piazzini et al., 2007a).

As colinesterases são uma família de enzimas que catalisam a hidrólise da ACh em colina e ácido acético, um processo essencial que permite a restauração do neurônio colinérgico. Existem duas formas principais de colinesterases em tecidos de mamíferos: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). AChE e BChE são similares, se assemelham uma a outra em mais de 50%, porém suas significâncias e localização no corpo humano são bastante diversas. AChE é expressada em neurônios colinérgicos e uma atividade relativamente elevada também pode ser observada nas células sanguíneas

responsáveis pela degradação plasmática da acetilcolina. A função primária da AChE é a rápida hidrólise da acetilcolina e o término da neurotransmissão colinérgica. Por outro lado, a BChE catalisa a hidrólise de uma variedade de ésteres do tipo colina e não colina (butirilcolina, succinilcolina, acetilcolina, ácido acetilsalicílico, cocaína e heroína) (Darvesh et al., 2003). Embora a atividade da BChE seja prevalente no corpo humano, sua função fisiológica ainda não é completamente compreendida. (Pohanka, 2011). Entretanto, sabe-se que a BChE é expressada em uma distinta população de neurônios e que é importante para a regulação da neurotransmissão colinérgica e desenvolvimento do sistema nervoso. Estudos recentes indicam que a BChE representa um importante alvo para a DA. Em pacientes com a DA, a atividade da AChE em certas áreas do cérebro já se encontra diminuída, entretanto, os níveis de BChE se encontram intactos ou até mesmo aumentados no estágio avançado da doença (Darvesh et al., 2003).

2.2.2. Placas amiloides e a hipótese da cascata amiloide

A “hipótese da cascata amiloide” postula que a formação excessiva da forma fibrilar insolúvel do peptídeo beta amiloide ($A\beta$), que conseqüentemente forma as placas amiloides ou placas senis, são o evento inicial na patogênese da DA (Hardy and Higgins, 1992). Esta hipótese se baseia originalmente em duas observações: a detecção de $A\beta$ como o constituinte principal das placas senis e a identificação de mutações nos genes da proteína precursora amiloide (APP) e da enzima γ -secretase (PSEN1 e PSEN2) que levam a doença de Alzheimer do tipo familiar (FAD) (Bertram et al., 2010). Depósitos conhecidos como placas amiloides são formados pela deposição progressiva do peptídeo beta amiloide $A\beta$ de 4kDa contendo 40 a 42 aminoácidos no seu subtipo mais tóxico em placas senis extracelulares. Em um cérebro saudável, esses fragmentos de proteína se quebram e são eliminados, Entretanto, na DA, os fragmentos se acumulam para formar placas rígidas e insolúveis. Um

grande número de evidências sugere que o A β é central para a pato-fisiologia da DA e parece ser o gatilho para o processo neurodegenerativo. Ab fibrilar em placas amiloides parecem causar o processo neurodegenerativo, embora estudos recentes sugerem que oligômeros solúveis de 1-42 A β também podem ser neurotóxicos. Ab é um peptídeo com 40-42 aminoácidos derivado da clivagem proteolítica da proteína chamada proteína precursora amiloide (APP), um tipo I de proteína integral de membrana. Em 1984, Glenner e Wong purificaram pela primeira vez a sequência do peptídeo A β (Glenner and Wong, 1984), que foi seguida pela identificação da APP como fonte de A β (Kang et al., 1987). Até o presente, três genes envolvendo a formação ou a clivagem da APP foram identificados como contendo mutações causais completamente penetrantes, resultando na DA prematura e foram descritas como geneticamente complexas (indicando que não existe um simples modo de herança que contribui para a sua hereditariedade) e heterogêneas. Estas mutações podem ser encontradas nos genes que codificam a APP, as proteínas preselina-1 e preselina-2. Mutações genéticas no sítio de clivagem da APP foram a etiologia descoberta relacionada ao desenvolvimento da DA familiar encontradas em uma família sueca. Os membros desta família apresentavam progressão antecipada da doença por volta dos 30 anos de idade (Pallas and Camins, 2006; Park, 2010). A maioria dos casos ocorre esporadicamente (DA esporádica ou SAD), enquanto que 1% dos casos são herdados de maneira autossômica dominante (FAD) (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991).

A proteína APP é clivada enzimaticamente por 3 diferentes proteases denominadas α , β -, e γ -secretases. As secretases são um grupo heterogêneo de proteases localizadas em várias regiões celulares. A ordem a qual estas proteases clivam a APP determina se o A β será ou não formado. Portanto, a clivagem da APP pela α -secretase produz fragmentos que servem de substrato para a γ -secretase, porém este processo não leva a formação do A β . Entretanto, a clivagem da APP na posição *N*-terminal pela enzima β -secretase é capaz de produzir um fragmento de peptídeo o qual é subsequentemente convertido pela γ -secretase

em A β 40 ou A β 42 (Figura 4). É provável que exista um passo adicional que determina qual forma de Ab será produzido (Pallas and Camins, 2006).

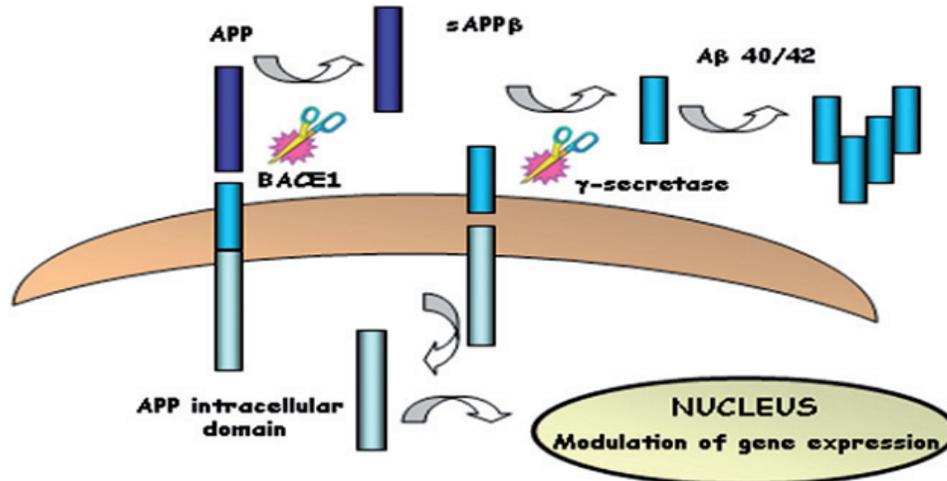


Figura 4. Processo amiloidogênico da proteína precursora amiloide (APP). A via amiloidogênica envolve a atividade da BACE1 que libera o fragmento A β PP produzindo um fragmento intracelular que é clivado pelo complexo enzimático da γ -secretase (Tabaton and Tamagno, 2007).

A figura 5 exemplifica as duas possíveis maneiras a qual a APP pode ser clivada. O caminho não amiloidogênico (não patogênico) inicia com a α -secretase, que libera o sAPPa externamente do endossoma ou da membrana celular. O fragmento C38 resultante é clivado pela γ -secretase no espaço intermembrana liberando o domínio intracelular amino-terminal APP (AICD) e o fragmento p3. A liberação do fragmento p3 no espaço extracelular não está associada com a formação das placas. Alternativamente, o caminho amiloidogênico (patogênico) inicia com a β -secretase, ao invés da α -secretase, e cliva a APP in a em uma região da membrana denominada "lipid raft". O fragmento amino terminal gerado pela β -secretase (sAPPb) é consideravelmente mais curto do que o fragmento amino terminal liberado pela α -secretase (sAPPa) e é também liberado externamente. A γ -secretase cliva a APP, da mesma envolvida no caminho não-patogênico, mas libera o amino ácido A β 38-42 e AICD. O fragmento liberado externamente, A β possui a capacidade de formar as placas amiloides por agregação.

Uma vez formado o peptídeo A β , uma porção pode sofrer oligomerização, inicialmente intravesicularmente, e pode ser liberado no líquido intersticial do cérebro, aonde oligômeros solúveis podem se difundir até as fendas sinápticas e interferir com as funções sinápticas por mecanismos desconhecidos. Os oligômeros de A β podem ainda se polimerizar em fibrilas amiloides insolúveis que se agregam em placas esféricas, resultando em tortuosidade e disfunção dos neurônios adjacentes e dendritos. Juntamente com estes eventos ocorre a ativação de proteínas quinases no citoplasma neuronal, levando a hiperfosforilação da proteína associada à microtúbulo tau, e sua polimerização em filamentos insolúveis que se agregam sob a forma de emaranhados neurofibrilares. Microglia ativada e astrócitos reativos envolvendo as placas participam em um processo inflamatório local que pode contribuir para neurotoxicidade (Selkoe, 2004).

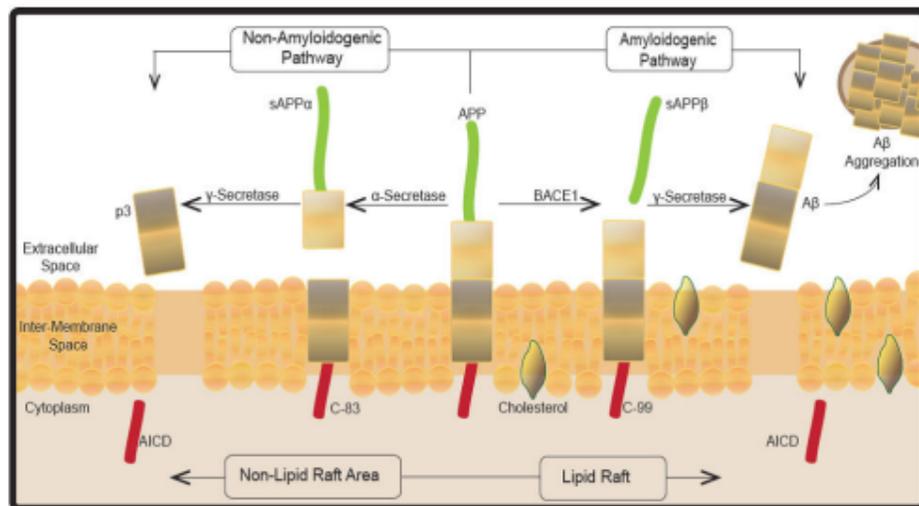


Figura 5. A clivagem da APP, dependente da BACE1 ou da α -secretase, resulta na produção das placas amiloides (Read and Suphioglu, 2013).

2.2.3. Emaranhados neurofibrilares e a hipótese da hiperfosforilação

Emaranhados neurofibrilares (NFT) são aglomerados anormais de fibras localizados dentro dos neurônios e consistem em pares de filamentos entrelaçados em filamentos helicoidais. Estes filamentos são formados pela proteína tau, uma proteína neuronal

associada à microtúbulo normal envolvidas na estabilização do mesmo. Na DA, a proteína tau se torna hiperfosforilada como resultado do desequilíbrio da atividade de quinases e fosfatases, que normalmente regulam o processo de fosforilação. Nestas condições, a proteína tau se desassocia dos microtubules que perdem a capacidade de se estabilizar e se auto-agregam, formando oligômeros e eventualmente emaranhados microscópicos (Churcher, 2006). Este perfil colapsa o sistema de transporte neuronal e pode primeiramente resultar em mau funcionamento na comunicação entre as células nervosas, perda da função neuronal e dano sináptico o que mais tarde pode afetar a memória recente, cognição e habilidades de aprendizagem, levando a demência (Viegas et al., 2005).

Na figura 6, os principais eventos intracelulares que contribuem para a morte neuronal na doença de Alzheimer são descritos, inclusive o papel da hipótese da hiperfosforilação da tau.

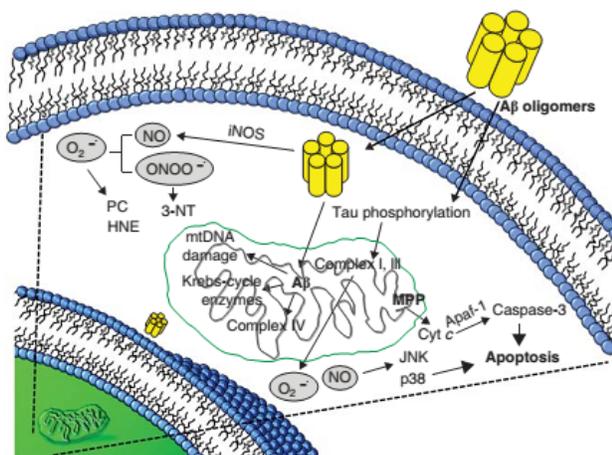


Figura 6. Os principais eventos intracelulares que contribuem para a morte de células neuronais na doença de Alzheimer. Uma vez formados, o peptídeo β -amiloide ($A\beta$) agregado exerce efeito tóxico por meio de: (a) o aumento da formação de ambas as espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente o ânion superóxido, e ativação de iNOS (NOS-2), levando a geração de óxido nítrico (NO), (b) comprometimento mitocondrial inibindo enzimas importantes envolvidas na cadeia respiratória e ciclo de Krebs e causando a fragmentação do DNA mitocondrial; (c) estimulação dos receptores de glutamato ionotrópicos NMDA e aumento da sobrecarga de Ca^{2+} que conduz, assim, a morte celular excitotóxica. Como consequência do primeiro mecanismo, o NO pode reagir com o superóxido gerando peroxinitrito ($ONOO^-$). Ambos ROS e $ONOO^-$ contribuem para a morte celular por oxidação ou a nitração de proteínas e lipídios que geram carbonilas proteicas (PC), 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e 3-nitrotirosina (3-NT) adutos de proteína. Ao nível mitocondrial, $A\beta$ ataca enzimas-chave envolvidas no ciclo de Krebs, tais como o α -cetoglutarato e piruvato desidrogenase, bem como complexo IV (citocromocoxidase), prejudicando assim o metabolismo da glicose e produção de energia. Além disso, $A\beta$ contribui para ativação de quinases envolvidas na hiperfosforilação da tau. A tau hiperfosforilada inibe o complexo mitocondrial I e sinergiza com um $A\beta$ para danificar mitocôndrias. Como consequência, a abertura de poros de transição de membrana mitocondrial ocorre e provoca a liberação do citocromo, ativação da caspase -3 e a morte celular por apoptose (Mancuso et al., 2011).

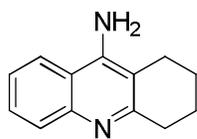
2.3 Tratamentos disponíveis para a DA

O tratamento atual para DA inclui inibidores da acetilcolinesterase e antagonistas do receptor de glutamato *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA). Entretanto, estas drogas fornecem somente alívio sintomático, benefícios a curto prazo, sem afetar o mecanismo patogênico da doença, embora um potencial neuroprotetor tenha sido proposto (Nordberg, 2006; Wu et al., 2009).

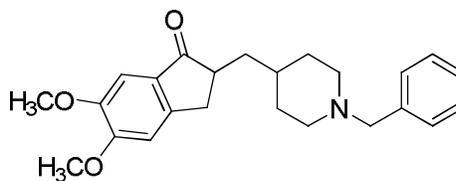
2.3.1. Inibidores colinesterásicos

A acetilcolina (ACh), um dos neurotransmissores presentes em ambos os sistemas nervosos central e periférico, é sintetizada a partir da colina e da coenzima A (acetil-CoA) pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) em alguns neurônios. Existem duas principais classes de receptores colinérgicos (AChR), *i.e.* nicotínicos ionotrópicos (nAChR) e muscarínicos metabotrópicos (mAChR). ACh na fenda sináptica é rapidamente degradada em dois metabólitos inativos, colina e acetato pela enzima acetilcolinesterase (AChE). Portanto, a neurotransmissão colinérgica pode ser melhorada por inibidores colinesterásicos (ChEI) pela prevenção da degradação da ACh.

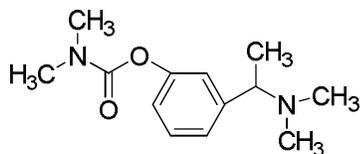
A hipótese colinérgica, pelo menos na sua formulação inicial, predizia um efeito favorável para compostos capazes de sustentar o tônus colinérgico central e também forneceu a primeira abordagem racional para o tratamento da DA. Quatro inibidores da acetilcolinesterase (AChEi) estão disponíveis atualmente para o tratamento da DA: tacrina (**1**), donepezia (**2**), rivastigmina (**3**) e galantamina (**4**) (Piazzini et al., 2007a).



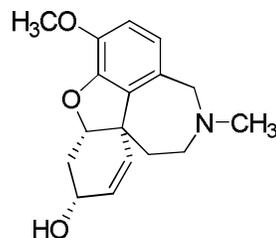
1



2



3



4

1. **Tacrina (1)** foi inicialmente sintetizada a mais de 50 anos atrás e foi a primeira droga sintética aprovada pelo FDA (Food and drug Administration) nos Estados Unidos da América para o tratamento da DA em 1933. Tacrina é inibidor colinesterásico reversível de ação central com atividade farmacológica adicional em níveis de monoamina e canais iônicos. Tacrina apresentou atividade para aliviar sintomas na DA de intensidade leve a moderada. Entretanto, sua utilização se tornou limitada devido a efeitos colaterais severos como hepatotoxicidade e a disponibilidade de outras drogas menos tóxicas (Racchi et al., 2004; Rufani et al., 1997).
2. **Donepezila (2)** é extensamente utilizada para retardar o declínio cognitivo em sujeitos em estágio leve a moderada da DA. Após a administração oral, a donepezila possui uma excelente biodisponibilidade e o pico de concentração plasmática é atingido em 3-4 horas. A droga se fortemente a proteínas plasmáticas o que pode contribuir para o tempo de meia vida prolongado ~ 70h. Esta droga é metabolizada pelo fígado, e é principalmente excretada pelos rins ainda que uma pequena parte da droga possa ser recuperada nas fezes. De um ponto de vista farmacodinâmico, a donepezila é um inibidor da AChE do tipo piperidínico, altamente seletivo e reversível possuindo somente atividade mínima contra a BChE. Além disso, pode atuar também

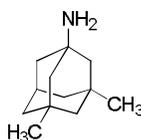
como ligante alostérico dos receptores de nicotina. Entre os efeitos colaterais da donepezila podemos citar dores no peito, náusea, êmese e perda de (Mancuso et al., 2011).

3. **Rivastigmina (3)** é bem absorvida pela via oral, a ligação a proteína plasmática é ~40 %, o pico de concentração plasmática é atingido em 1 h e o tempo de meia vida é ~1,5 – 2 h. O metabolismo da rivastigmina é rápido e extenso e ocorre principalmente via hidrólise mediada pela colinesterase gerando o metabólito NAP-226-90 o qual sofre conjugação com sulfato no fígado sendo excretado pelos rins.. Farmacodinamicamente, rivastigmina é um inibidor pseudo-reversível não seletivo da AChE pois também inibe a BChE com igual potencia. Além disso, a rivastigmina forma um complexo com ambas as AChE e BChE, caracterizado por uma ligação covalente, o que torna o complexo mais resistente à hidrólise podendo afetar o tempo de meia vida desta droga. Os principais efeitos colaterais envolvem tontura, anorexia, náusea, vômitos e dispepsia (Mancuso et al., 2011).
4. **Galantamina (4)** é um alcaloide terciário isolado de várias plantas incluindo espécies de *narcissus* bem como Caucasian snowdrop (*Galanthus nivalis*). Possui um modo de ação único sendo um inibidor competitivo reversível da AChE e também um modulador alostérico dos receptores nicotínicos de acetilcolina (Racchi et al., 2004). Esta droga possui uma excelente biodisponibilidade após a administração oral, porém baixa afinidade por proteínas plasmáticas (15-30%) e curto tempo para atingir concentrações pico (1-2 h) e meia vida (5-7 h). A galantamina é metabolizada pelo fígado e principalmente excretada pelos rins. Galantamina também inibe a citotoxicidade induzida por NO e, portanto, impede a morte neuronal (Mancuso et al., 2011). Os efeitos colaterais incluem náusea, diarreia, vômitos, perda de peso e doenças vasculares (ataque cardíaco e infartos) (Park, 2010).

2.3.2. Antagonistas dos receptores de glutamato NMDA

A neurotoxicidade mediada pelo glutamate foi proposta como uma possível etiologia e alvos terapêuticos foram direcionados para esta via no tratamento da DA. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro. O glutamato media a sua função fisiológica pela interação com receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e quinato) e metabotrópicos. O aumento excessivo dos níveis de glutamato nas fendas sinápticas acima de valores fisiológicos favorece o processo de excitotoxicidade e induz a morte neuronal pela ativação de receptores de NMDA na membrana de neurônios pós-sinápticos. Uma vez os receptores NMDA são ativados, um aumento excessivo de cálcio pode resultar em ativação de proteínas que induzem a hiperfosforilação da tau e ativação de enzimas proteolíticas levando a uma morte apoptótica das células. Portanto, pode ser especulado que qualquer desordem no SNC caracterizada por um processo excitotóxico irá promover um processo de morte neuronal, o qual pode ser prevenido com o tratamento utilizando um antagonista dos receptors de NMDA (Pallas and Camins, 2006).

5. **Memantina (5)** é um antagonista não competitivo dos receptors NMDA que bloqueia o canal dos receptors NMDA com baixa afinidade e previne um fluxo excessivo de cálcio dentro das células (Pallas and Camins, 2006). Após administração, a memantina é quase completamente absorvida, atingindo picos plasmáticos em 6-8 h. Cerca de 50% da droga é excretada inalterada pelos rins, enquanto que o restante é convertido em derivados glucoronídeos e excretados pela urina. Os principais efeitos colaterais são tontura, constipação, catarata, náusea, dispneia, confusão, dores de cabeça e incontinência urinária (Mancuso et al., 2011)



5

2.4. Novas terapias

Embora inibidores da acetilcolinesterase estejam entre os maiores alvos para a farmacologia da DA, o desenvolvimento de novas drogas capazes de modificar a evolução da doença e assim alterar a progressão da DA estão entre os maiores desafios da química medicinal moderna. Dentro deste contexto, muitos esforços estão sendo direcionados para o estudo de agentes capazes de modificar a doença baseados na hipótese amiloide considerando a formação, agregação e eliminação do peptídeo A β . Além disso, a descoberta das funções não clássicas da enzima AChE (Silman and Sussman, 2005) também colaboraram para o surgimento de uma nova visão sobre os inibidores da acetilcolinesterase e o seu papel no processo neurodegenerativo da DA.

2.4.1. A hipótese da cascata amiloide

A formação das placas amiloides é uma das principais características presentes no cérebro com a DA. Esta observação levou a elaboração de uma proposta por Hardy e colaboradores (Hardy and Higgins, 1992) a qual preconiza que essas placas são críticas para o processo neurodegenerativo. Uma recente modificação desta hipótese implica que os precursores destas placas (oligômeros de A β) são os verdadeiros agentes causantes. Duas estratégias terapêuticas distintas consistentes com essa proposta vêm sendo investigadas e incluem a inibição das enzimas proteolíticas envolvidas com a formação do A β (moduladores das secretases) e a redução dos oligômeros de A β . Esta última pode ser alcançada ou pela inibição da agregação do peptídeo ou pelo aumento na taxa de eliminação dos oligômeros (Williams et al., 2011).

2.4.2. Inibidores da secretase

O bloqueio da produção de A β pela inibição de proteases chaves (β - e γ - secretases) exigidas para a geração do A β é o maior foco das pesquisas para a terapia da DA. Existem 2 principais enzimas alvo na via amiloidogênica: BACE1 (enzima de clivagem do sítio beta da APP 1, ASP2 ou memapsina 2) e BACE2 (enzima de clivagem do sítio beta da APP 2, ou memapsina 2, ASP1 ou memapsina 1). Ambas as enzimas emergiram como potentes alvos terapêuticos para a intervenção na DA. Embora elas sejam muito similares, existem diferenças sutis considerando seus sítios de ação e uma ponte dissulfeto extra para a BACE1. A β -Secretase foi primeiramente isolada em 1999 por diversos grupos (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999) sendo expressada principalmente no cérebro enquanto que a BACE2 é frequentemente expressada no coração e raramente no cérebro. Portanto acredita-se que como a BACE1 é a maior constituinte de β -secretase no cérebro, esta deve ser o alvo para o desenho de novas drogas para o tratamento da DA (Bennett et al., 2000). Além disso, muitas evidências confirmaram a β -secretase como sendo um alvo terapêutico para a DA. Um inibidor da β -secretase conjugado com um peptídeo carreador para permitir a passagem pela barreira hemato-encefálica demonstrou alcançar o cérebro e reduzir os níveis de Ab no cérebro de camundongos (Chang et al., 2004). Imunização de β -secretase que reduziu os níveis de A β no cérebro também melhoram o desempenho cognitivo em modelos de camundongos com DA (Chang et al., 2007). Camundongos transgênicos heterozigotos b-secretase "knock out" com uma redução de 15% de A β no cérebro demonstraram um declínio dramático de placas na idade avançada (McConlogue et al., 2007), sugerindo que uma redução limitada do A β pode atingir o objetivo terapêutico. Embora tenha sido sugerido que a β -secretase é necessária para a mielinização e a ligação correta dos axônios para as células de Schwann (Willem et al., 2006), a β -secretase ainda assim parece ser o alvo ideal para a terapia da DA. A γ -secretase foi identificada como sendo um complexo multiproteico

intermembrana aonde a presenilina 1 e a presenilina 2 são duas subunidade catalíticas para a clivagem do fragmento C-terminal. Entretanto, resultados experimentais indicaram que inibidores da γ -secretase irão afetar a via de sinais Notch, a qual está relacionada com o crescimento de células nervosas (Bell et al., 2006).

A estrutura cristalina da BACE1 demonstra que ela apresenta duas conformações principais, a forma ativa e a forma inativa que se diferenciam principalmente pela região de abertura (resíduos 69-75). A abertura adota uma conformação mais aberta na forma ativa do que na forma inativa (Huang et al., 2009).

A β -secretase como um alvo terapêutico para a DA oferece muitas vantagens. Primeiramente é esta enzima que inicia a produção de A β sem uma atividade compensatória como demonstrado pela ausência de A β quando o gene para a b-secretase é deletado. A inibição deste alvo deve gerar uma redução de A β e, portanto, representa uma terapia capaz de modificar a evolução da doença, bem como elimina os passos patogênicos sucessivos relacionados com a presença de A β . Em segundo lugar, a deleção do gene para a β -secretase em camundongos produziu somente poucas mudanças comportamentais, sugerindo que a inibição desta enzima é segura para os pacientes. Em terceiro lugar, considerando o sucesso precedente do desenvolvimento de drogas inibidoras da protease HIV, também um protease aspártica, favorece o prospecto do desenvolvimento de um inibidor da β -secretase para ser utilizado clinicamente (Ghosh et al., 2008).

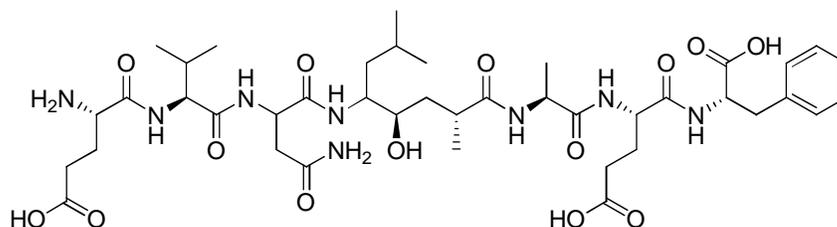
A β -secretase e a APP são ambas as proteínas transmembranas do tipo I presentes na superfície das células. Entretanto, a hidrólise da APP pela β -secretase ocorre intracelularmente, após a proteína ser endocitada dentro dos endossomos ou nos retículos endoplasmáticos e complexos de Golgi em rota para a superfície da célula. Os compartimentos subcelulares onde a β -secretase exerce sua atividade possuem interior ácido, perto do pH ótimo para a atividade da protease. Uma droga inibidora da β -secretase deve ser capaz de penetrar as membranas celulares para alcançar o sítio da enzima. Além

disso, devido a maior parte de A β ser produzida no cérebro, o inibidor também deve ser capaz de penetrar a barreira hemato-encefálica (Ghosh et al., 2008).

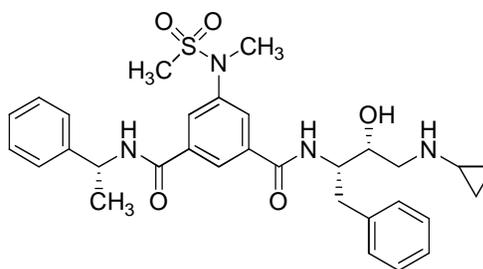
Foi pressuposto então que inibidores da β -secretase devem ser drogas de tamanho pequeno, potentes e análogos seletivos do estado de transição, com boa capacidade de penetrar membranas e propriedades farmacológicas. Tamanhos pequenos, menores do que 500 Da, geralmente permitem a passagem livre através da membrana hemato-encefálica. Um elevado valor de constante de inibição K_i (nmol/l) é desejado para minimizar a dose efetiva e, portanto, diminuir qualquer efeito colateral em potencial (Ghosh et al., 2008).

A primeira geração de inibidores OM99-2 (**6**) e OM00-3 foram desenhados utilizando o conhecimento sobre a especificidade do mecanismo catalítico da BACE1. Esses inibidores são peptídeos análogos do estado de transição e são de fato muito potentes, com valores de K_i na região nm e forneceram um excelente ponto de partida para a evolução da estrutura e das propriedades dos inibidores. O inibidor IV (**7**), um composto peptídeo mimético hidroximetilamina (HEA), é o composto atualmente disponível mais ativo e é caracterizado pelo seu tamanho reduzido quando comparado com o OM99-2. Compostos peptídeo miméticos de estado de transição, hidroxietileno e derivados da HEA dominaram os esforços para o desenvolvimento de inibidores potentes da BACE1 humana. Entretanto os compostos peptídeo miméticos são moléculas relativamente grandes, caracterizadas por ponte de hidrogênio múltiplas, o que os tornam menos atraentes devido a sua baixa capacidade de penetração por membranas e baixa biodisponibilidade. Portanto, existe um grande interesse direcionado para a descoberta de novos inibidores da BACE1 não peptídicos com um novo esqueleto químico adequado para a penetração no SNC com propriedades farmacocinéticas mais apropriadas. Recentemente, uma revisão do desenvolvimento de inibidores não peptídicos pelas indústrias farmacêuticas foi publicada ressaltando o grande impulso em pesquisas de novos inibidores da BACE1 (Silvestri, 2009).

Atualmente os inibidores da β -secrease são compostos químicos já conhecidos que possuem um potencial terapêutico limitado por possuírem elevado peso molecular o que provavelmente restringe a sua transferência através da barreira hemato-encefálica (Natarajan et al., 2013).



6



7

2.4.3. Substâncias anti-agregação amiloide

A “hipótese amiloide” sugere que a forma solúvel de $A\beta$ sofre uma mudança conformacional que ocasiona a sua agregação em fibrilas ricas de estruturas de β -hélice (Natarajan et al., 2013). A redução das concentrações de oligômeros de $A\beta$ pela inibição da agregação ou pelo aumento da taxa de eliminação destes oligômeros solúveis ou de suas placas fibrilares insolúveis pode ser uma possível estratégia terapêutica para a DA e está atualmente sob investigação. Uma droga anti-agregante ideal deveria ser capaz de prevenir a formação dos agregados de $A\beta$, além de desestabilizar as placas bem como reduzir os depósitos já existentes. Embora os oligômeros sejam mais tóxicos do que as placas fibrilares

insolúveis, ambos causam a neurodegeneração por dois processos apoptóticos diferentes. Portanto, uma droga ideal deveria inibir os dois processos (Williams et al., 2011).

A maioria dos compostos já descobertos são capazes de inibir somente a fibrilogênese, contudo, inibidores da oligomerização seriam mais promissores. De um modo geral, esses compostos são desenhados para perturbar as ligações fracas existentes entre os resíduos das fibrilas em conformação beta, pois interferem nas ligações de hidrogênio ou nas interações eletrostáticas. Esses compostos são geralmente pequenos (baixo peso molecular) e são ou lipofílicos ou possuem um grande número de substituintes polares capazes de competir pelas ligações de hidrogênio. Poucos exemplares destas moléculas pequenas apresentaram atividades na faixa μM ou nM , e aqueles que apresentaram maior atividade possuem outros problemas (como ausência de biodisponibilidade, inabilidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, falta de especificidade) o que não permitiu que se tornassem candidatos a protótipos. Entretanto, muitos destes compostos não possuem toxicidade e, além disso, possuem bioatividades múltiplas (*i.e.* antioxidante, anti-inflamatória, inibidores enzimáticos) o que podem ter efeito adicional na luta contra os diversos fatores patológicos da DA (Williams et al., 2011).

2.4.4. Inibidores das colinesterases

Embora algumas linhas de evidências sugiram que os inibidores da acetilcolinesterase possuem um efeito farmacológico direto na DA, seu uso foi questionado. Os inibidores da AChE parecem ser capazes de bloquear algum dos processos neurodegenerativos fundamentais envolvidos na DA pela modulação das funções “não clássicas” relacionadas a enzima AChE (Silman and Sussman, 2005). Existem evidências bioquímicas sugerindo que a AChE acelera a agregação do A β em fibrilas amiloides, atuando como moléculas chaperonas. A identificação do sítio periférico (PAS) da AChE responsável por esse efeito pró-agregante,

forneceu a base para o desenvolvimento de novos inibidores duais da AChE capazes de interagir não somente com o sítio ativo mas também com o sítio periférico da enzima (Bolognesi et al., 2009c). Em outras palavras, a AChE desempenha um importante papel na deposição de A β em placas amiloides além da sua função catalítica clássica. A AChE atua como uma promotora da agregação de A β em placas amiloides, sendo este efeito independente de sua atividade de hidrólise normal (De Ferrari et al., 2001). Portanto, a enzima AChE ainda é um alvo válido para a DA e continua a ser explorado.

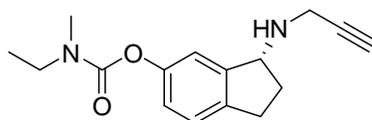
2.4.5. Drogas com efeitos multi-alvos

Devido à complexidade da DA e o envolvimento de diferentes enzimas em sua evolução, a modulação de uma proteína única pode não ser suficiente para produzir o efeito terapêutico desejado. A diversidade dos eventos relacionados com a DA e a atual falta de uma teoria única aceitável para sua etiologia vem há muito tempo impedindo o desenvolvimento de uma droga efetiva para o seu tratamento. Além disso, embora a velocidade das pesquisas tenha aumentado nos últimos anos, o reconhecimento de vários alvos e vias relacionadas com a DA, todas as drogas disponíveis no mercado são monofuncionais, atingindo somente um alvo dentre os inúmeros envolvidos na patogênese da DA. Portanto, a DA ainda permanece uma área que necessite de descobertas clínicas excepcionais (Bolognesi et al., 2009a).

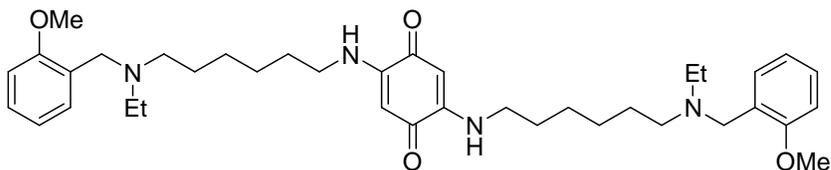
Diferentes abordagens farmacológicas oferecem a possibilidade de superar os problemas enfrentados com o uso de drogas monofuncionais. Primeiramente, uma combinação de drogas, capazes de fornecer um benefício adicional, pode ser eficientemente utilizada para atingir os múltiplos processos patológicos. A terapia combinatória já se provou eficaz para o tratamento de doenças complexas como câncer, AIDS, hipertensão, aonde a técnica atingiu uma eficácia máxima pelo ataque de diversos alvos simultaneamente,

exploração do sinergismo e minimizando efeitos tóxicos individuais. Na DA, a terapia combinatória vem se tornando um tratamento padrão. Geralmente, o regime terapêutico compreende o uso concomitante de inibidores da AChE e memantina, devido aos seus distintos mecanismos de ação. Além disso, a co-administração de terapias tradicionais e não tradicionais (vitamina E, extrato de *Ginkgo biloba*) podem formar uma estratégia de sucesso em um futuro próximo. A segurança e a efetividade destes e de outros agentes em pacientes com a DA está ainda sob debate. Entretanto, existe um crescente número de evidências que sugerem que os efeitos sinérgicos podem provir da combinação de agentes que já apresentaram alguma eficácia na terapia da DA e que estão direcionados com diferentes mecanismos da corrente patogênica (Bolognesi et al., 2009a).

Dentro deste contexto, os pesquisadores estão se voltando para o desenvolvimento de compostos capazes de atuar simultaneamente em diferentes alvos visando aumentar a probabilidade de um desfecho favorável (Piazzi et al., 2007b). Portanto, foi proposta uma mudança da estratégia “uma proteína, um alvo, uma droga” para uma estratégia visando o desenvolvimento de drogas que afetem simultaneamente múltiplos alvos. Essa abordagem originou um novo paradigma na química medicinal conhecida como a estratégia do “ligante direto multi-alvo” (Zhang, 2005). Embora esta abordagem esteja ainda no seu início, a prova deste conceito já foi obtida com o desenvolvimento da droga bifuncional ladostigil (**8**), a qual combina em uma única molécula o efeito neuroprotetor de um inibidor seletivo da monoamino oxidase B (MAO-B) (rasagilina) com a atividade anticolinesterásica da droga rivastigmina (Yogev-Falach et al., 2006). Seguindo esta estratégia, muitos novos ligantes foram desenvolvidos capazes de atuar em alvos múltiplos relacionados com a DA. Alguns destes ligantes se encontram em estudos pré-clínicos como a memoquina (**9**), uma poliamina com núcleo quinona capaz de inibir a agregação espontânea e induzida pela AChE do peptídeo A β e a sua formação pela inibição da enzima β -secretase (BACE1) podendo ainda atuar como antioxidante (Bolognesi et al., 2007a; Cavalli et al., 2007).



8



9

Com o advento de ensaios *high-throughput*, os quais permitem detectar o perfil de um grande número de compostos contra um grande número de alvos, a natureza multifuncional de muitas drogas já existentes foi verificada e provavelmente deve ser esperada para a maioria dos agentes terapêuticos (Morphy et al., 2004).

Drogas multi-alvo recentes foram principalmente desenhadas estudando a estrutura 3D de moléculas anteriores com atividade conhecidas e a estrutura cristalina de proteínas alvos. Esta informação está focalizada no desenho virtual de novas entidades químicas que incluam mais de uma atividade em uma molécula única (Marco-Contelles et al., 2013).

A abordagem multi-alvo vem sendo utilizada para descrever os benefícios no uso da terapia combinatória. Atualmente é largamente aceito no tratamento de doenças complexas como o câncer que o uso de diversas drogas monofuncionais específicas em combinação leva a resultados melhores do que quando o tratamento é feito com cada uma individualmente. Estes efeitos podem ser explicados pela alteração de diversas vias patológicas interconectadas, modificando o progresso da doença. Este tipo de terapia abriu uma ampla linha de pesquisa para cientistas de diferentes áreas. A definição de correlações e links entre as conexões patológicas e o uso desta informação para o desenho de novas drogas potenciais. Portanto, o retorno das informações entre todos os diferentes campos será crucial para o sucesso na pesquisa de uma droga capaz de modificar a DA. Avanços

futuros irão resumir todos os conhecimentos sobre o progresso fisiopatológico da doença e as diferentes relações entre eles, visando alcançar o equilíbrio ideal da atividade biológica na droga multi-alvo (Marco-Contelles et al., 2013).

2.5. Produtos naturais e a doença de Alzheimer

Os produtos naturais possuem uma longa história de usos terapêuticos. A natureza é uma fonte rica de diversidade biológica e química. As estruturas únicas e complexas dos produtos naturais não são facilmente obtidas pela química sintética. Em práticas tradicionais, numerosas plantas vêm sendo utilizadas para o tratamento de distúrbios cognitivos, incluindo doenças neurodegenerativas. A abordagem etnofarmacológica forneceu provas para identificar plantas e novas drogas em potencial que são relevantes para o tratamento de distúrbios cognitivos incluindo a DA (Natarajan et al., 2013).

Os recentes avanços em farmacologia são baseados no desenvolvimento de conceitos como genômica, proteômica e genômica química, os quais permitiram a descoberta de novas moléculas. Além disso, a conquista da diversidade química pela química combinatória também levou ao descobrimento de um grande número de alvos moleculares para serem testados contra agentes terapêuticos em potencial utilizando ensaios de *high-throughput*. Apesar dos avanços nas técnicas de extração e isolamento utilizado na química de produtos naturais, existem poucas abordagens sistemáticas a serem seguidas durante a descoberta de produtos naturais biologicamente ativos. Além disso, 63% de drogas de baixo peso molecular descobertas entre 1981 e 2006 são produtos naturais ou derivados de produtos naturais. A maioria dos compostos examinados até o momento com que apresentaram relevância para a DA são primariamente obtidas a partir de plantas, em comparação a poucas moléculas derivadas de fontes marinhas e microbianas. Até o momento o maior sucesso foi obtido a partir de programas baseados na descoberta de drogas

anticolinesterásicas a partir de produtos naturais os quais forneceram duas das drogas atualmente aprovadas comercialmente para o tratamento da DA (Park, 2010; Williams et al., 2011).

Até o momento, 2 dos 3 inibidores da colinesterase liberados para o tratamento da demência nos países ocidentais são de origem natural (galantamina **(4)** e rivastigmina **(3)**, um derivado semi-sintético da fisostigmina **(10)**) e um outro composto natural a huperzina A **(11)**, isolada da espécie *Huperzia serrata*, é um inibidor colinesterásico licenciado utilizado para o tratamento da DA na China. Portanto, parece compreensível encontrar novos compostos anti-DA quando se exploram fontes naturais, Além disso, compostos baseados em estruturas de compostos naturais são melhores tolerados do que seus congêneres sintéticos, o que é um aspecto favorável para a aprovação de novas drogas (Brunhofer et al., 2012).

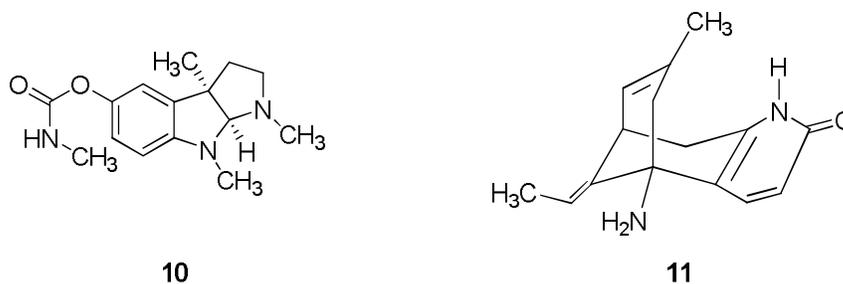
2.5.1. Os alcaloides e a doença de Alzheimer

Os alcaloides vêm sendo, desde o início do processo da descoberta de drogas para o tratamento da DA, o maior foco das pesquisas considerando a hipótese colinérgica devido às descobertas preliminares e o sucesso obtido. Entretanto, com o avanço no entendimento das múltiplas vias envolvidas no desenvolvimento e evolução da DA, as pesquisas com os produtos naturais também foram redirecionadas para novos alvos. Como resultado, várias classes de metabólitos secundários, incluindo os alcaloides, começaram a ser avaliados e novos compostos ativos foram descobertos. Os resultados sugerem que os compostos naturais possuem um grande potencial para o desenvolvimento de compostos bioativos com atividade anti-DA (Park, 2010).

A fisostigmina **(10)**, um alcaloide isolado de *Physostigma venenosum* L., Fabaceae, foi o primeiro inibidor da acetilcolinesterase (Synapton[®]) utilizado na terapia da DA. Este

alcaloide possui um efeito rápido e embora atue como um inibidor reversível contra ambas as colinesterases, é mais seletivo para a AChE. Entretanto, este composto não é mais utilizado clinicamente devido ao seu curto tempo de meia-vida, sua estreita janela terapêutica e seus efeitos gastrintestinais e ortostáticos. Sua estrutura química serviu como modelo para o desenvolvimento da rivastigmina, outra substância com um melhor perfil farmacocinético atualmente utilizada para a terapia da DA (Konrath et al., 2013b; Wang et al., 2009).

A huperzine A (**11**) é um alcaloide do tipo quinolizidínico isolado da espécie *Huperzia serrata* species (Thunb) Trevis., Lycopodiaceae, native da China, aonde já vem sendo utilizada por muitos anos para o tratamento de desordens cognitivas. Atualmente está sob investigação pré-clínica para o tratamento da DA e apresentou poucos efeitos colaterais quando comparada a outros inibidores comerciais. Um estudo realizado por Anekonda e Reedy em 2005 apresenta uma lista dos efeitos sinérgicos em combinação de plantas com efeitos positivos e negativos para o tratamento da DA. A huperzina A demonstrou ser um inibidor potente seletivo e reversível da AChE, com biodisponibilidade oral, capaz de cruzar a barreira hemato-encefálica com um tempo de meia-vida prolongado (Anekonda and Reddy, 2005).



Além disso, considerando que a DA é de fato uma desordem neurodegenerativas complexa resultado da interação entre múltiplos alvos, os produtos naturais podem

apresentar um valor farmacológico adicional uma vez que muitos compostos possuem naturalmente efeitos múltiplos simultaneamente como antioxidantes, anti-inflamatórios, quelante de metais (antioxidantes indiretos), antidepressivos, inibidores da monoaminoxidase (MAO)-B entre outros e, portanto, estão de acordo com a nova ordem para a descoberta de novas drogas considerando efeitos em múltiplos alvos.

2.5.2. Alcaloides como inibidores das enzimas colinesterases

Entre os produtos naturais, os alcaloides são considerados como sendo os candidatos mais promissores para o tratamento da DA devido as suas estruturas complexas contendo nitrogênio. De fato, um dos sítios de ligação com a AChE envolve a interação do nitrogênio carregado positivamente com resíduos de aminoácidos presentes na AChE, muito embora, existam outros possíveis sítios de interação os quais permitem a inibição por compostos do tipo não alcaloides, principalmente terpenos, xantonas e cumarinas (Konrath et al., 2013b).

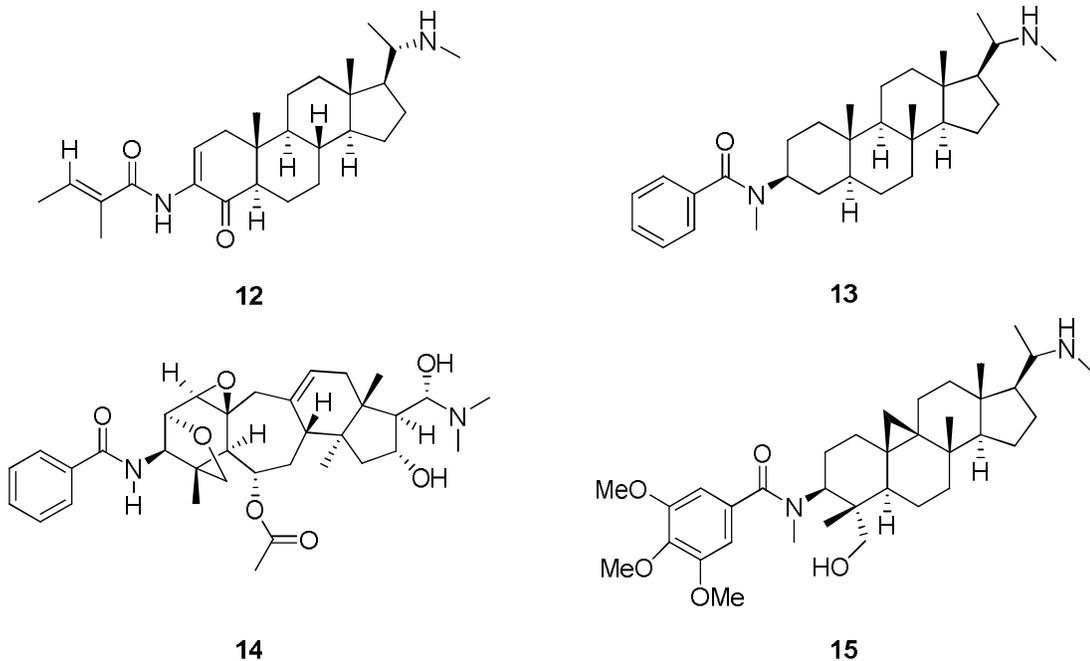
Além dos alcaloides fisostigmina (**10**), rivastigmina (**3**) e galantamina (**4**) já descritos, um grande número de outros alcaloides apresentaram propriedades para agir como inibidores da AChE. Muitas tentativas para sintetizar inibidores da AChE utilizando fisostigmina como protótipo foram realizadas visando o desenvolvimento de análogos com vantagens terapêuticas sobre a rivastigmina. Alguns destes inibidores potentes e seletivos foram modulados farmacologicamente para possuírem modo de ação duplo, para atingir ambos os sintomas cognitivos e depressivos da DA (Williams et al., 2011).

Alcaloides de diversas classes merecem uma ênfase adicional devido a sua potente atividade inibitória, incluindo os alcaloides do tipo isoquinólicos das famílias Amariyllidaceae (especialmente encontrados em *Narcissus* sp., *Galantus* sp., *Hypeastrum* sp.) e Papaveraceae, os alcaloides esteroidais da família Buxaceae (gênero *Buxus* e *Sarcococca*), o tipo

quinolizidínicos da família Lycopodiaceae (gênero *Huperzia* e *Lycopodium*) e os alcaloides indólicos das famílias Apocynaceae e Rubiaceae dentre outros.

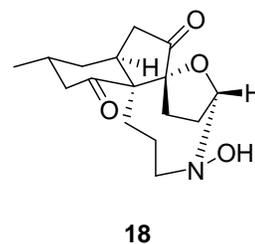
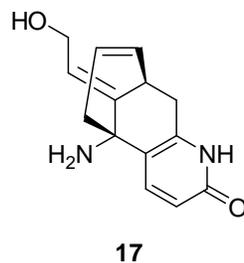
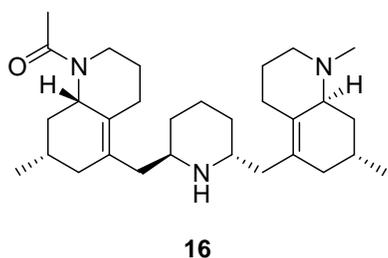
Os alcaloides ativos pertencentes às classes dos esteroides e triterpenoides estão distribuídos em espécies de *Solanum*, *Veratrum* e *Fritillaria* bem como na família Buxaceae, principalmente nos gêneros *Buxus* and *Sarcococca*. O gênero *Sarcococca* é conhecido pela produção dos alcaloides do tipo pregnano. Estes metanólitos possuem substituintes mono- ou dimetilamino nos carbonos C-3 e/ou C-20 do esqueleto básico esteroidal. Muitos alcaloides deste gênero apresentaram atividade anticolinesterásica com valores de IC₅₀ entre 0.5 - 249 µM para AChE sendo o (+)-fulcowkiamide A (**12**) o mais ativo. Para a BChE os valores de IC₅₀ variam de 0.3 a 200 µM, sendo hookerianamide I (**13**) o mais ativo. Estes tipos de alcaloides são geralmente mais seletivos para a BChE. A seletividade poder ser explicada pelo maior tamanho dos alcaloides esteroidais que podem se difundir mais facilmente no centro aromático maior da BChE do que no menor da AChE (Konrath et al., 2013b).

O gênero *Buxus* é conhecido por ser uma rica fonte de alcaloides triterpenoides do tipo ciclo artenol possuindo os mesmos átomos de nitrogênio em C3 e/ou C20 como no gênero *Sarcococca*, e, por essa razão, também são reconhecidos como fontes de inibidores de ambas as enzimas AChE e BChE. Os valores de IC₅₀ variam de 3.0 (O²-natafuranamine, **14**) a 468 µM para AChE, enquanto que para a BChE os valores variam entre 0.74 (buxakashmiramine, **15**) a 350 µM (Konrath et al., 2013b).



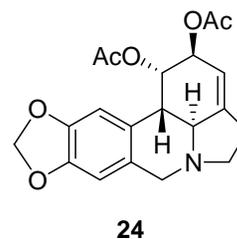
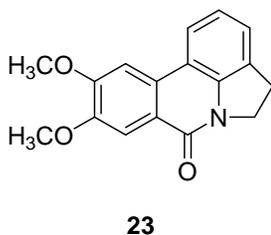
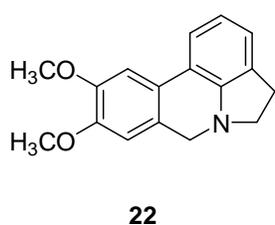
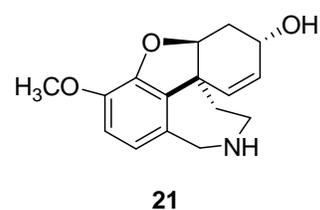
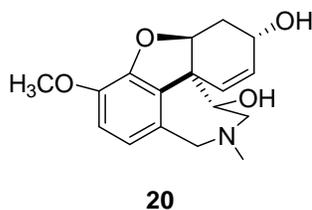
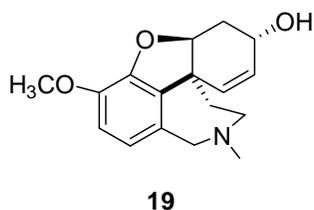
Dentre os alcaloides do tipo quizolidínicos/licopodiáceos, o composto mais proeminente é a huperzina A (**11**) sendo responsável pelo interesse crescente na investigação de espécies da família Lycopodiaceae. Halldorsdottir e colaboradores (2010) isolaram 10 alcaloides licopodiáceos de *Lycopodium annotinum* subsp. *alpestre* coletada na Islândia e avaliaram suas atividade anticolinesterásicas *in vitro*. Como resultado, o inibidor mais potente foi a anhidrolicodina (IC_{50} 191 μ M), e licofolina (IC_{50} 600 μ M), enquanto que para a BChE somente a licodolina foi capaz de inibir a enzima com um valor elevado de IC_{50} (667 μ M).

Alguns outros alcaloides *Lycopodium* diversos também foram estudados quanto a capacidade de inibir a AChE. O mais ativo foi a criptadina B (**16**) (IC_{50} 18.5 mM) isolada de *L. cryptomerinum*. Entretanto, outros alcaloides com o mesmo esqueleto inibiram a enzima com maiores valores de IC_{50} . Por outro lado, carinatamina A (**17**), um alcaloide licodínico, da classe da huperzina A, isolado de *L. carinatum*, foi muito mais ativo como já esperado (IC_{50} 5.6 μ M). Sieboldina A (**18**), um derivado fawacetimina é um dos alcaloides *Lycopodium* mais ativos com valores de IC_{50} 2.0 μ M (Konrath et al., 2013a; Konrath et al., 2013b).

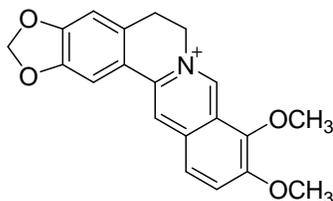


Os alcaloides da família Amaryllidaceae representam o maior grupo de alcaloides isoquinólicos, a maioria conhecidos por pertencer exclusivamente a esta família. Estes alcaloides podem ser classificados em nove tipos de esqueletos, sendo os representantes respectivamente: norbeladina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina, montanina e galantamina.

Considerando a inibição da AChE, os compostos mais ativos, com valores de IC_{50} perto de 10^{-6} M pertencem ao tipo galantamina. Sanguinina (**19**), galantamina (**4**), 11 α -hidroxi-galantamina (**20**) e epinorgalantamina (**21**) inibiram a AChE de peixe elétrico (EeAChE) com valores de IC_{50} variando de 0.10 a 9.6 μ M (Lopez et al., 2002). Dentre outras subclasses de alcaloides da família Amaryllidaceae, o mais potente inibidor das colinesterases parecem ser àqueles compostos pertencentes ao tipo licorina, sendo assoanina (**22**) (EeAChE IC_{50} 3.85 μ M), oxoassonina (**23**) (EeAChE IC_{50} 47.2 μ M) e 1-*O*-acetil-licorina (**24**) (IC_{50} 0.96 μ M) os mais ativos deste grupo (Konrath et al., 2013b).



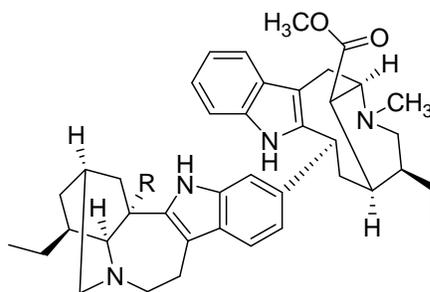
Dentre os alcaloides isoquinólicos o alcaloide quaternário berberina (**25**) apresentou um valor de EeAChE IC_{50} igual a $0.58 \mu\text{M}$ e um valor de BChE IC_{50} $3.44 \mu\text{M}$. Este alcaloide ganhou atenção considerável devido ao seu vasto espectro de atividades bioquímicas e efeitos farmacológicos. Ele atua na AChE, BChE, MAO e outras enzimas. Adicionalmente a berberina pode reduzir os níveis de $A\beta$ por alterar o processamento da APP em células de neuroglioma humano (Asai et al., 2007; Hung et al., 2010; Hung et al., 2008).



25

2.5.2.1 Alcaloides indólicos como inibidores da acetilcolinesterase

Os alcaloides indólicos nitrantina, hisurtina, rawolscina, catarantina, augustina, lactona valesiacotamina e *E/Z* valesiacotamina demonstraram inibição seletiva da BChE com valores de IC_{50} entre 3.77 a $14 \mu\text{M}$. Orhan e colaboradores (2007) também avaliaram os efeitos contra AChE e BChE de alguns alcaloides indólicos como yoimbina e vincamina aonde a yoimbina apresentou atividade contra BChE. O fracionamento bio-guiado de *Tabernaemontana divaricate*, Apocynaceae, levou ao isolamento de 19,20-dihidrotabernamina (**26**) e 19,20-dihidroervahanina A (**27**). Ambos os compostos inibiram a atividade da EeAChE com valores de IC_{50} 227 e 71 nM respectivamente (Ingkaninan et al., 2006).



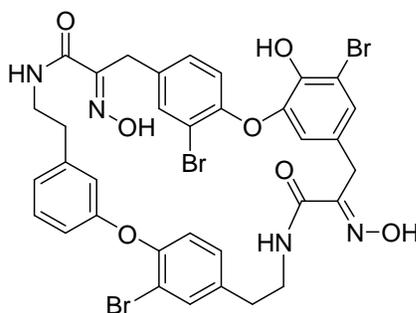
26 R=H
27 R=CO₂CH₃

2.5.3. Alcaloides como inibidores das secretases

Até 2010, de acordo com uma revisão publicada por Williams e colaboradores (Williams et al., 2011), não existem registros de um inibidor direto da enzima γ -secretase oriundos de fontes naturais. Até julho de 2010, somente 49 inibidores da β -secretase derivados de produtos naturais foram descritos ($IC_{50} < 100 \mu M$) dentre os quais somente 3 apresentaram valores de IC_{50} abaixo de $1 \mu M$ (bastadina 9, luteolina, neocorylina). Entretanto, nenhum produto natural apresentou ainda a atividade abaixo de $100 nM$ comparados aos candidatos pré-clínicos sintéticos. A grande maioria dos inibidores relatados são flavonoides, incluindo flavonas e compostos fenólicos relacionados (Williams et al., 2011).

Apesar do grande número de alcaloides sintéticos capazes de inibir a BACE1, poucos alcaloides de origem natural foram descritos com esta atividade. Esponjas marinhas pertencentes à família Thorectidae e o gênero *Smenospongia* em particular, são fontes conhecidas de alcaloides indólicos. A avaliação de uma espécie do Panamá *S. cerebriformis* Duchassaing & Michelotti (Thorectidae) identificou uma bis-2-amino-imidazolona incomum, diactazole A, capaz de inibir fracamente a BACE1 (Dai et al., 2010). Este composto foi considerado de interesse, uma vez que a conformação 2-imino-imidazólica é considerada uma subunidade privilegiada responsável pela atividade observada em muitos compostos não relacionados estruturalmente (Hills and Vacca, 2007).

O produto natural marinho bastadina 9 (**28**), isolado de *Lanthella basta* Pallas, Lanthallidae também possui a capacidade de reduzir o processamento de APP via inibição da BACE1. Bastadina 9 inibiu a clivagem de APP via BACE1 com valor de IC₅₀ 0.3 e 2.8 μM em ensaios enzimáticos e com linhagens celulares respectivamente (Williams et al., 2010).



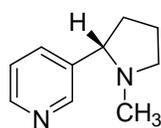
28

A partir dos rizomas de *Coptis chinensis* Franch. outros dois alcaloides de nome *epi-berberina* e *groelandicina* foram isolados e apresentaram atividade inibitória incompetitiva com valores de IC₅₀ de 8.55 e 19.68 μM respectivamente (Jung et al., 2009). Em particular, a *groelandicina* além de diminuir a produção de Aβ pela inibição da β-secretase, também possui efeitos inibitório potentes contra a AChE e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Park, 2010). Outro alcaloide isoquinólico chamada *neferina*, isolado das sementes de embriões de *Nelumbo nucifera* Gaertn., Nelumbonaceae, exerceu uma inibição moderada contra a BACE1 (Jung et al., 2010).

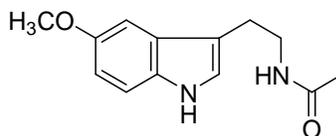
2.5.4. Alcaloides promovendo anti-agregação e eliminação

Somente alguns alcaloides de origem natural foram descritos como capazes de afetar diretamente a agregação de Aβ. *Nicotina* (**29**), encontrada na família Solanaceae, afeta múltiplos estágios da amiloidogênese *in vitro*. Foi descrita a capacidade deste composto na inibição da formação, extensão e desestabilização de Aβ40 e Aβ42. Entretanto não foi capaz

de quebrar os agregados em seus respectivos oligômeros e monômeros (Ono et al., 2002). Admiravelmente os níveis das placas amiloides se encontravam significativamente reduzidas em camundongos transgênicos após 5.5 meses de tratamento. Além disso, estudos *in vivo* também sugerem que a nicotina aumenta a agregação e a fosforilação da tau o que pode ser um efeito colateral não desejado (Nordberg et al., 2002). A melatonina (**30**) é outro alcaloide anti-agregante encontrado em muitos organismos. Causa perturbação das pontes entre os resíduos de histidina e aspargina na conformação beta do A β o que facilita a sua eliminação. Ao contrário de muitos compostos, a melatonina pode efetivamente ultrapassar a barreira hemato-encefálica (Pappolla et al., 1998).



29



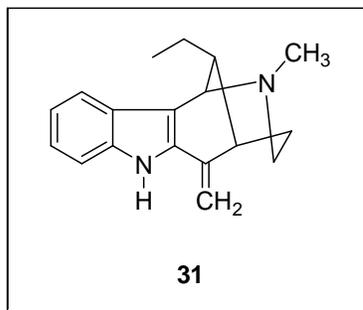
30

Extratos de *Uncaria rhynchophylla* Miq., Rubiaceae, foram descritos como sendo benéficos para a DA. O extrato de *Uncaria rhynchophylla* reduziu a formação de agregados A β de modo dose dependente de acordo com o ensaio utilizando a tioflavina T. Além disso, as fibrilas ou agregados de A β foram dissociados pelo tratamento com *U. rhynchophylla*, indicando que o extrato desestabiliza a agregação de A β (Fujiwara et al., 2006). Os principais constituintes incluindo os alcaloides oxindólicos e indolólicos como corinoxeina, hisurtina e hirsuteina foram identificados como agentes anti-agregantes obtidos a partir de extratos de *U. rhynchophylla*. Estes compostos também apresentaram atividade neuroprotetora agindo pela inibição da neurotoxicidade induzida pelo glutamato em células granulares cerebelares (Shimada et al., 1999).

2.5.5. Uleína

A uleína (**31**), o principal alcaloide indólico extraído das cascas das raízes de *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson (Apocynaceae), apresentou uma atividade inibitória promissora contra a enzima AChE de peixe elétrico (IC₅₀ 45 µM) (Seidl et al., 2010). *H. lancifolius* é um espécie native brasileira, conhecida popularmente como “agoniada”, preferencialmente encontrada nas regiões nordestes e sudeste do Brazil. A monografia desta espécie se encontra na primeira Farmacopéia Brasileira de 1929 com o seu antigo nome científico *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. (Silva et al., 2004). Esta espécie possui uso popular para o tratamento de desordens de pele, como antiasmática, purgativo, para o tratamento da sífilis, desordens menstruais, adenites, clorose, febre intermitente, problemas digestivos e histeria. Também é usada popularmente para induzir contrações uterinas e como vermífugo (Brandão et al., 2006). A casca das raízes da *H. lancifolius* é quimicamente caracterizada pela presença de diversos alcaloides indólicos como yoimbina, uleína, *epi*-uleína, ajmalina e demetoxiaspidospermina (França et al., 2000; Souza, 2007). Uma lista de atividades foi descrita para a sua fração rica em alcaloides. Primeiramente um amplo espectro de atividade antimicrobiana *in vitro* contra microrganismos patogênicos (Souza et al., 2004), um efeito gastroprotetor desta fração aonde a uleína era o composto majoritário (Baggio et al., 2005), bem como a capacidade de alterar a resposta vascular e não-vascular da musculatura lisa (Rattmann et al., 2005) foram descritos.

Além da atividade contra a EeAChE, a uleína também possui a capacidade de interferir na produção de ácido nítrico, o que pode possuir um valor adicional uma vez que o óxido nítrico está envolvido em muitos processos fisiológicos importantes como inflamação, e neurotransmissão (Souza et al., 2007).



2.6. Ensaio enzimáticos

Inúmeros métodos foram desenvolvidos para avaliar a atividade enzimática, *i.e.* métodos radioquímicos, espectrométricos e cromatográficos. Entretanto, estes métodos apresentam muitas desvantagens como baixa solubilidade e estabilidade da enzima, falta de reprodutibilidade, alto custo e longo tempo de análise (Bartolini et al., 2005; Bertucci et al., 2003).

A motivação para trazer novas drogas ao mercado de uma maneira mais rápida sem impactos negativos na qualidade e segurança induziu ao desenvolvimento de novas estratégias e metodologias associadas. De fato, aspectos chaves no processo de descoberta envolvem metodologias rápidas (*high throughput screening*) para a avaliação da atividade biológica, a análise das interações das drogas com as biomoléculas e a determinação das propriedades físico-químicas das drogas candidatas como forma de prever as características de administração, distribuição, metabolismo e excreção (Bertucci et al., 2003).

A necessidade de novas drogas estimulou a pesquisa para o desenvolvimento de drogas capazes de atuar como inibidores enzimáticos e o *screening* de inibidores capazes de se ligar seletivamente à enzima de interesse se tornou um alvo de interesse para a indústria farmacêutica. Portanto, existe uma necessidade para o desenvolvimento de técnicas capazes de diminuir o número de possíveis candidatos. Uma alternativa promissora é o uso de técnicas cromatográficas e estudos de afinidade de drogas (Cardoso et al., 2009).

A descoberta de novas drogas envolve uma estratégia robusta para o desenvolvimento de ligantes que exija uma consideração especial das características estruturais e uma análise detalhada das atividades biológicas de um grande número de compostos. Algumas destas características envolvem a ligação a alvos específicos, o reconhecimento por enzimas específicas, receptores ou proteínas de membrana. A finalização de atividade de uma droga potencial está relacionada com sua afinidade a um alvo biológico, o que reflete na sua constante de afinidade para a macromolécula alvo (Bertucci et al., 2003).

Os processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos envolvidos na ação de drogas como absorção, distribuição, metabolismo, modulação e ativação de receptores, são dinâmicos por natureza e possuem muito em comum com os mecanismos básicos envolvidos em cromatografia líquida. As principais interações como as interações do tipo eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio são cruciais tanto para os processos biológicos como para os cromatográficos. Uma vez que a atividade e o metabolismo das drogas são mediados por diferentes tipos de interações com alvos biológicos, as avaliações destas interações podem ser utilizadas em estudos de afinidade para a elucidação do mecanismo de ação de uma droga (Freitag, 1999).

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando biorreatores ou reatores de enzimas imobilizadas (IMER) como fases estacionárias (alternativamente chamado de biocromatografia) provou ser uma metodologia promissora para o *high throughput screening* (HTS) para a seleção de compostos ativos (protótipos). Embora esta técnica tenha sido primeiramente desenvolvida para o isolamento e purificação de misturas biológicas complexas, tem demonstrado ser uma ferramenta poderosa e preditiva para o monitoramento de interações entre proteínas-ligantes, enzimas e substratos, inibidores e enzimas e ligantes e receptores. Este processo fornece seletividade cromatográfica, rapidez e reaproveitamento da enzima, além da reprodutibilidade obtida pela combinação da

especificidade e sensibilidade das reações enzimáticas (Hage, 2002; Kaliszan and Wainer, 1997; Wainer et al., 1993; Wainer and Noctor, 1993).

Enzimas empacotadas em colunas cromatográficas vêm sendo amplamente utilizadas em sistemas em fluxo com uma variedade de proteínas e aplicadas para o estudo de inibição (Bartolini et al., 2003; Bartolini et al., 2004, 2005, 2007b; Bartolini et al., 2009; Cardoso et al., 2006; de Moraes et al., 2012; Nicoli et al., 2008).

Considerando o custo elevado e a dificuldade na expressão, isolamento e purificação de enzimas recombinantes, esta técnica analítica representa uma abordagem extremamente útil para preservar a atividade de uma pequena quantidade de enzima, para a execução de estudos cinéticos e para a rápida detecção de candidatos em potencial (Bartolini et al., 2005).

O procedimento de imobilização é sempre um processo que pode afetar a estabilidade da enzima devido ao microambiente não natural aonde se desenvolve. Portanto, durante o desenvolvimento de um biorreator novo, a escolha específica da matriz sólida para a imobilização enzimática constitui um passo crítico para garantir elevado rendimento, poucas interações não específicas com o substrato, produtos e inibidores. Além disso, a inserção do biorreator em um sistema CLAE para obter o fluxo através do IMER adiciona estresse de fricção, restrições de difusão e interações não específicas que podem afetar a avaliação do comportamento catalítico (Bartolini et al., 2005).

Existem diversos tipos de matrizes sólidas que podem ser utilizadas como suportes em procedimentos de imobilização (Cardoso et al., 2009; Girelli and Mattei, 2005). Entretanto, monólitos são considerados uma nova geração de fases estacionárias as quais apresentam como característica principal a rápida separação e conversão enzimática devido a ausência de resistência de difusão durante a transferência de massa. Monolitos são fases estacionárias contínuas que são montadas como colunas homogêneas em um pedaço único

e preparadas em dimensões variáveis com microestruturas fibrosas ou do tipo aglomeradas (Josic and Buchacher, 2001).

Suportes monolíticos representam uma nova era de separação cromatográfica. Devido aos seus largos diâmetros de canais internos e seu suporte de transferência de massa convectiva (CIM[®] (Convective Interaction Media) oferecem uma excelente capacidade de separação, estabilidade excepcional e características de fluxo especiais para grande s biomoléculas (pDNA, vírus, anticorpos monoclonais) (BIA Separations, 2014).

O Disco CIM[®] (Figura 7) consiste em uma matriz CIM[®] de um polímero metacrilato poroso e um anel externo não poroso que assegura somente um fluxo axial através do disco e previne qualquer vazamento de amostra ou fase móvel. Isto assegura que toda a fase móvel é direcionada pelo volume total da matriz. Além disso, o disco CIM[®] possui uma distribuição de canais de tamanhos bem definidos fornecendo uma excelente separação em baixas pressões de retorno. O invólucro do CIM[®] fornece uma excelente distribuição, manuseio simples e permite a fácil conexão a qualquer sistema de CL/CLAE (BIA Separations, 2014).

Suportes monolíticos CIM[®] combinam as vantagens das colunas de cromatografia tradicional empacotadas com partículas porosas em termos de capacidade de separação, capacidade e distribuição da amostra com aqueles da tecnologia de membrana em termos de transporte convectivo de massa. Comparando estes dois tipos de suportes, suportes cromatográficos CIM[®] apresentam muitos benefícios, especialmente para a purificação de biomoléculas grandes. Elevada capacidade de ligação, recuperação e poder de resolução são outras características dos monolitos CIM[®] e, além disso, todas estas características são praticamente independentes. Suportes do tipo CIM[®] apresentam ainda baixa ligação não específica de biomoléculas resultando em elevadas taxas de recuperação (BIA Separations, 2014).



Figura 7. CIM® EDA disco monolítico e seu invólucro (BIA Separations, 2014).

Os poros grandes do material monolíticos permitem alta rapidez de análise e baixa pressão de retorno. Experimentos preliminares realizados com enzimas imobilizadas em suportes porosos compactos demonstraram que estes reatores enzimáticos apresentam taxas de conversão muito maiores do que reatores aonde as enzimas foram imobilizadas em suportes não porosos (Abou-Rebyeh et al., 1991). A superfície do suporte aonde a enzima é imobilizada possui um papel importante para a retenção da estrutura terciária da enzima o que influencia muito na atividade térmica e atividade catalítica da enzima imobilizada (Girelli and Mattei, 2005).

Discos de EDA-CIM® para a imobilização são suportes monolitos amino ativados obtidos através da reação dos grupos epóxi nativos com etilenodiamina (EDA). Os monolitos EDA-CIM® podem ser utilizado para a cromatografia de afinidade ou bioconversão pela imobilização de proteínas, peptídeos e outros ligantes através da reação com um reagente bifuncional adequado *i.e.* glutaraldialdeído (BIA Separations, 2014).

Portanto, a escolha do suporte sólido para a imobilização reduz a quantidade de enzima a ser imobilizada e contribui para um melhor acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (Bartolini et al., 2004).

Um grande número de técnicas está disponível para a imobilização de enzimas. A imobilização pode ser obtida através de técnicas *in situ* ou *in batch*. Quando se emprega o procedimento *in batch* a enzima é primeiramente imobilizada em um suporte e então é

empacotada na coluna utilizando uma técnica de empacotamento rápido, enquanto que a abordagem *in situ*, a enzima é diretamente imobilizada na coluna pré-empacotada. A segunda técnica é considerada a melhor maneira de se obter resultados satisfatórios em termos de ligação da enzima e retenção da atividade enzimática uma vez que o empacotamento *in batch* uma grande perda da atividade pode ser observada (Girelli and Mattei, 2005).

O método mais comum para o *medium-* ou *high-throughput screening* de inibidores da enzima BACE1 humana (hrBACE1) envolve ensaios fluorimétricos em placas de 96b poços e são baseados nos princípios de transferência da energia de ressonância fluorescente (FRET). O substrato para o ensaio FRET consiste em um doador de fluorescência ligado por uma cadeia peptídica a um receptor desta fluorescência. Uma vez clivado pela hrBACE1, o rendimento quântico do doador é reestabelecido e a atividade enzimática é relacionada linearmente ao aumento da fluorescência (Kennedy et al., 2003).

O princípio do método pode ser observado na Figura 8. Resumidamente, no substrato integro a fluorescência do substrato é extinta pelo receptor adjacente. Quando a cadeia peptídica é clivada pela hrBACE1, a fluorescência específica do receptor não é mais extinta e pode ser mensurada; um aumento na fluorescência pode ser proporcionalmente relacionado com a taxa de proteólise. Da mesma forma, o aumento da fluorescência é perdido quando ocorre a inibição devido a presença de compostos testes.

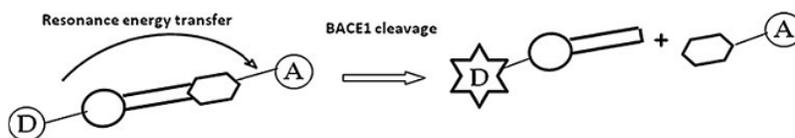


Figura 8 . :Princípio do ensaio de transferência da energia de ressonância de fluorescência. Após a clivagem enzimática a transferência de energia é perdida e o rendimento total quântico do doador é reestabelecido. *D* doador, *A* receptor (Mancini et al., 2011).

hrBACE1 possui uma baixa especificidade para substratos. Na verdade, uma variedade de substratos peptídicos são geralmente utilizados nos ensaios FRET-hrBACE1; os

mais comuns são substratos fluorogênicos que mimetizam a sequência Swedish mutada da APP, a qual é reconhecida e clivada pela hrBACE1 100 vezes mais rápido do que a o tipo selvagem de APP (Ermolieff et al., 2000).

Um grande número de substratos estão comercialmente disponíveis para os ensaios FRET envolvendo a hrBACE1. O fluofóro e o acceptor estão localizados nas terminações *N*- e *C*- terminais de uma cadeia hexa ou dodecapeptídica respectivamente. Eles se diferenciam principalmente na estrutura pelos pares de doador e acceptor e no tamanho da cadeia peptídica, o que afeta o reconhecimento do substrato e a taxa de clivagem. A escolha do melhor substrato é determinada por diversos fatores capazes de influenciar o desempenho do ensaio, como a taxa de clivagem, concentração do substrato, a eficiência da extinção da fluorescência, a razão entre o sinal de fundo e o sinal do ensaio e o limite de detecção da atividade da hrBACE1 (Mancini et al., 2011).

3. Justificativa

A acetilcolinesterase humana (hrAChE) é atualmente considerada um importante alvo para o desenvolvimento de drogas utilizadas no tratamento da doença de Alzheimer (DA) baseada não somente na "hipótese colinérgica", a qual tem como objetivo descobrir inibidores da enzima AChE seletivos e potentes capazes de manter elevados os níveis de acetilcolina nos receptores muscarínicos e nicotínicos no sistema nervoso central (Cummings and Back, 1998; Perry, 1986), mas também devido as importantes interações descobertas entre os sistemas colinérgicos e amiloides na DA (Pakaski and Kalman, 2008). Essas novas descobertas encorajaram a procura por novos inibidores da AChE como drogas capazes de não somente reduzir os sintomas da DA, mas também capazes de prevenir ou retardar a degeneração dos neurônios colinérgicos atuando como inibidores da enzima β -secretase gerando uma abordagem terapêutica alternativa e potencialmente curativa para a DA.

A uleína, o principal alcaloide extraído das cascas das raízes de *Himatanthus lancifolius* (Mull. Arg.) Woodson, Apocynaceae, apresentou uma atividade inibitória promissora contra a enzima AChE de peixe elétrico (IC_{50} 45 μ M) (Seidl et al., 2010).

A busca por novas drogas capazes de interagir com múltiplos alvos relacionados coma a DA sustenta a relevância de novas investigações visando a descoberta de novas atividades inibidoras para a uleína.

Além disso, o desenvolvimento de ensaios enzimáticos novos, reprodutíveis, automáticos e seletivos capazes de superar as já conhecidas dificuldades dos métodos tradicionais para melhor caracterizar novos inibidores potentes é um problema atual e um objeto de grandes pesquisas ao redor do mundo. Esta abordagem é particularmente promissora na área de produtos naturais, uma vez que pode colaborar para diminuir o tempo necessário entre a detecção da bioatividade em um extrato ou derivado de produtos naturais

e a identificação química do composto ou compostos responsáveis por esta atividade (Jong et al., 2006).

4. Objetivos

O presente trabalho possui dois objetivos principais. Primeiramente, a avaliação da atividade do alcaloide indólico uleina nos alvos validados relacionados com a doença de Alzheimer. Dentre eles as enzimas acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e β -secretase e também o peptídeo beta amiloide.

Em segundo lugar o desenvolvimento e aplicação de um método cromatográfico novo, rápido e automatizado com detecção por fluorescência para a detecção de inibidores da enzima β -secretase utilizando o substrato peptídico fluorogênico ácido 4-(4-dimetilaminofenilazo) benzóico e ácido 5-[(2-aminoetil) amino]napheleno-1-sulfônico (substrate IV).

5. Parte experimental

5.1 Reagentes e solvents

Acetilcolinesterase humana recombinante (E.C. 3.1.1.7, expressa em células HEK 293, pó liofilizado, $\geq 1,500$ unidades/mg de proteína), butirilcolinesterase de soro humano (≥ 50 unidades/mg proteína), iodeto de acetilcolina, iodeto de S-butilcolina, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB, reagente de Ellman), β -secretase humana (recombinante, expressa em células HEK 293, domínio extracelular, $\geq 10,000$ unidades/mg proteína, o seu produto de hidrólise padrão ácido [5-(2-amino-etilamino)-1-naftaleno sulfônico, 1,5-EDANS] e tioflavina T foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Substrato IV [(NH₂-Arg-Glu(EDANS)-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Lys(DABCYL)-Arg-COOH] foi adquirido da Calbiochem (La Jolla, CA, USA), e o inibidor IV obtido da Merck (Darmstadt, Germany).

O substrato peptídico M-2420 e seu produto de hidrólise de referência (metoxicumarina-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-OH, fragmento MCA) foram adquiridos da Bachem (Germany).

O peptide β -amiloide (1-42) pó liofilizado foi adquirido da Bachem (Bubendorf, Switzerland).

Acetato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), fosfato de sódio, CHAPS (3-[(3-holamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato), ácido acético, sódio azida, glutaraldeído, monoetanolamina, cianoborohidreto de sódio, placas de 96 poços pretas Corning foram obtidos da Sigma-Aldrich (Milan, Italy).

Os discos EDA-CIM[®] (3 mm x 12 mm I.D., 0.34 ml volume interno) foram gentilmente doados pela Bia Separation (Aidoscina, Slovenia).

Todos os outros produtos químicos utilizados eram de grau analítico (Carlo Erba Reagent e Sigma-Aldrich) e foram utilizados sem demais purificações. A água utilizada para o preparo das soluções e fases móveis foi purificada por um aparelho purificador Milli-RX (Millipore, Milford, MA, USA) e filtrada por uma membrana de 0.22 µm e degasada antes do uso.

Os ensaios em solução foram realizados em um espectrofluorômetro Fluoroskan modelo Ascent (diâmetro ótico 3 mm). A hidrólise do substrato fluorogênico foi realizada em um volume final de reação de 200 µl pelo acompanhamento do aumento da fluorescência em placas escuras de 96 poços. Os pares de exc/em foram fixados em 320/405 nm para o M-2420 e 355/485nm para o Substrato IV.

O sistema de CLAE consistia em uma bomba Jasco modelo PU-1580 conectada a um amostrador automático Jasco modelo AS-2055 e um detector Jasco FP-2020 (Jasco, Cremella, Italy). A detecção de fluorescência foi fixada em 320/420 nm para o M-2420 e 355/490 nm para o Substrato IV.

5.3. Material vegetal

As cascas das raízes de *Himatanthus lancifollius* (Mull. Arg.) Woodson, Apocynaceae, foram adquiridas comercialmente nos arredores da cidade de São Paulo, Brasil. A espécie foi identificada de acordo com a descrição presente na Farmacopéia Brasileira I e pela comparação macroscópica e microscópica com amostras autênticas do Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba aonde um voucher da espécie se encontra depositado (No. 9)

5.2.1. *Extração, isolamento e identificação da uleína*

A uleína foi isolada utilizando o mesmo procedimento já descrito por Baggio e colaboradores (2005). Resumidamente, as cascas das raízes secas (5 kg), previamente desengorduradas com *n*-hexano, foram maceradas por 48 h em HCl 1%. A extração procedeu até que não fosse obtida reação positiva com o reagente de Dragendorff. O extrato ácido foi filtrado, basificado até pH 10 com carbonato de sódio, fracionado com clorofórmio e evaporado, resultando em uma fração rica em alcaloides (AIKf). Essa fração foi redissolvida em HCl 1%, filtrada e congelada. Uma pequena porção da AIKf foi purificada utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (*n*-hexano: DCM: MeOH: dietilamine 5:4:0.8:0.2) para a obtenção da uleína como um composto isolado (Baggio et al., 2005). A identificação da uleína foi realizada utilizando métodos espectroscópicos e comparadas com amostras originais previamente identificadas. Os dados espectrais encontrados em literatura confirmaram que o composto isolado era a uleína (C₁₈H₂₂N₂) (França et al., 2000; Gaskell and Joule, 1967; Joule and Djerassi, 1964).

5.4. Ensaio em solução

5.4.1. *Ensaio de inibição com as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase*

Uma solução estoque de acetilcolinesterase (AChE) foi preparada dissolvendo o pó liofilizado da enzima AChE recombinante humana em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 contendo Triton-X (0,1%).

Uma solução estoque da enzima butirilcolinesterase (BChE) foi preparada dissolvendo o pó liofilizado da enzima BChE de soro humano em uma solução aquosa contendo gelatina (0,1%).

A determinação da atividade anticolinesterásica foi realizada de acordo com o método de Ellman modificado (Ellman et al., 1961). Resumidamente, cinco soluções de concentrações crescentes de uleína (95.5-955 μM , concentrações finais) foram preparadas em metanol e cada solução incubada por 20 min a 37 °C com a solução do ensaio (tampão fosfato 0,1 M pH 8,0, DTNB 340 μM , 0,02 unit/ml of hrAChE or hBChE de soro humano) seguido pela adição do substrato 340 μM (iodeto de acetiltiocolina, ATCh ou iodeto de butiriltiocolina, BTCh) em uma cubeta de 1 ml de volume. A reação foi monitorada a 412 nm por 5 min e a atividade enzimática obtida a partir do coeficiente angular resultante da regressão linear. As concentrações de uleína foram analisadas para obter o percentual de inibição enzimático entre 20 até 80%. Controle negativo contendo todos os componentes do ensaio com exceção das respectivas enzimas foram também analisados para desconsiderar qualquer aumento da absorvância devido a uma reação não-enzimática. As taxas das reações foram comparadas e os valores percentuais da inibição devido a presença da uleína foram calculados de acordo com a seguinte equação (1):

$$\text{inibição hrAChE/hBChE (\%)} = 100 - \left[\left(\frac{\text{taxa da reação enzimática sem a amostra}}{\text{taxa da reação enzimática com a amostra}} \right) \times 100 \right]$$

Cada concentração da amostra foi testada em duplicata e os valores de IC50 determinados graficamente a partir do logaritmo das curvas de concentração-% inibição (GraphPad Prism 4.03 software, GraphPad Software Inc.). O mesmo procedimento foi realizado para o controle positivo do ensaio, o inibidor conhecidos das colinesterases, tacrina.

5.4.2. *Análise cinética da inibição da enzima acetilcolinesterase de peixe elétrico pela uleína*

Para a obtenção das constantes de inibição K_i , o gráfico do duplo-recíproco $1/[V]$ versus $1/[S]$ foi construído com diferentes concentrações do substrato iodeto de acetiltiocolina (0,2-15 mM) utilizando o método de Ellman (Ellman et al., 1961). Os experimentos foram realizados em um placas de 96-poços transparentes com um volume final de reação 250 μ l, contendo em cada poço DTNB 1,5 mM, 25 μ l da solução de controle ou inibidor. A reação teve início com a adição de 25 μ l de AChE de peixe elétrico (eelAChE) (concentração final 0,266 U/ml). A reação foi monitorada a 412 nm por 2 min em um espectrofotômetro leitor de microplacas MultiskanTM FC (Thermo Scientific, USA). As curvas obtidas foram obtidas e os valores de regressão linear adequados de acordo com o gráfico de Lineweaver-Burk utilizando o software GraphPad Prism 5.0. e analisados pelo método dos mínimos quadrados. A determinação das constantes de Michalis-Menten para o substrato acetiltiocolina foram realizadas em 5 concentrações, os coeficientes de regressão linear foram então plotados para cada valor de uleína analisado (0-375,4 μ M) e o valor de K_i determinado.

5.4.3. *Ensaio de inibição da enzima beta-secretase*

Os ensaios de inibição para a enzima beta-secretase recombinante humana (hrBACE1) foram realizados de acordo com o seguinte procedimento: 5 μ l da amostra ou DMSO (controle negativo) foram pré-incubados por 1 h a 37°C com 165 μ l da enzima de concentração final 21,8 nM e 10,9 nM para o substrato M-2420 e para o substrato IV respectivamente. Ambas as soluções foram preparadas em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5 contendo CHAPS 0,1% (p/v).

Após o tempo de incubação, 20 µl de M-2420 (3 µM, concentração final) ou Substrato IV (5 µM, concentração final) em tampão HEPES 10 mM pH 7,5 foram adicionados e incubados por mais 30 min a 37°C. O sinal de fluorescência foi mensurado a $\lambda_{em}/\lambda_{exc} = 405/320$ nm para o M-2420 e $\lambda_{em}/\lambda_{exc} = 485/355$ nm para o Substrato IV.

A intensidade do sinal de fluorescência foi comparada na presença e na ausência do composto teste e o percentual de inibição foi calculado. O controle negativo foi realizado contendo todos os reagentes menos a enzima e o substrato para descartar qualquer aumento da fluorescência devido a interferência dos solventes utilizados. A concentração de final de DMSO foi mantida abaixo de 5% (v/v) para não interferir na atividade da enzima. O % de inibição devido a presença de concentrações crescentes do composto teste foi calculado através da seguinte equação (2):

$$\text{hrBACE1 inibição (\%)} = 100 - \left[\left(\frac{Fi}{F0} \right) \times 100 \right]$$

Onde Fi e F0 são as intensidades de fluorescências da atividade da enzima hrBACE1 obtidas na presença e na ausência do composto teste, respectivamente. As curvas de inibição foram obtidas para cada composto plotando o % de inibição *versus* o logaritmo da concentração do composto testado. Os parâmetros de regressão linear foram obtidos e o valor de IC₅₀ extrapolado.

Para o ensaio com a uleína, 5 µl da solução de uleína (concentração final de 125 nM to 1µM) foram pré-incubados com 175 µl uma solução de hrBACE1 (concentração final 8,34 nM em tampão acetado de sódio 20 mM pH 4.5 contendo CHAPS 0,1% (p/v). 20 µl de substrato IV (concentração final 5 µM) em tampão HEPES 10 mM pH 7,5 foram adicionados e após 30 min a 37°C o sinal de fluorescência foi mensurado a $\lambda_{exc} = 355$ nm ($\lambda_{em} = 485$ nm). A concentração de final de DMSO foi mantida abaixo de 5% (v/v) para não interferir na

atividade da enzima. Os parâmetros de regressão linear foram obtidos e o valor de IC_{50} extrapolado.

5.4.4. Ensaio da inibição da agregação espontânea do peptídeo beta-amiloide (1-42)

Para investigar a inibição da agregação espontânea do peptídeo beta-amiloide (1-42) um ensaio fluorimétrico utilizando a tioflavina T (ThT) foi realizado.

Primeiramente, o peptídeo beta amiloide fragmento 1-42 ($A\beta_{42}$) foi pré-tratado dissolvendo-o em 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFIP) ($0,67 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,149 \text{ mM}$) seguido de intervalos agitação alternada em sonicador e vórtex e foi mantido *overnight* em sob temperatura controlada (25°C). No dia seguinte, a solução límpida resultante foi particionada em tubos de microcentrifuga de propileno siliconados sob banho de gelo ($0,157 \text{ mg}$ aliquots), e o solvente HFIP deixado para evaporar *overnight* a 25°C . A película de peptídeo resultante foi utilizada para os experimentos de agregação e se mantém estável por meses se armazenada a -20°C (Bartolini et al., 2007a).

A película de $A\beta_{42}$ foi redissolvida em uma recém-preparada mistura ($69,5 \mu\text{l}$) de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Na}_2\text{CO}_3$ ($0,3 \text{ mM}/250 \text{ mM}$) NaOH ($48,4:48,4:3,2$) alternando o a agitação por sonicador e vortex. A solução alcalina resultante ($[A\beta_{42}] = 500 \mu\text{M}$) foi diluída 1:10 com tampão fosfato (10 mM , $\text{pH } 7.7$) contendo NaCl (11 mM) para obter uma solução $50 \mu\text{M}$ de $A\beta_{42}$ em pH final $8,0$ e concentração de NaCl 10 mM . As condições finais do ensaio foram as seguintes: $50 \mu\text{M}$ $A\beta_{42}$ em tampão fosfato (8.7 mM) contendo 10 mM NaCl , $14,5 \mu\text{M}$ Na_2CO_3 , $0,85 \text{ NaOH}$ e $8,2\%$ CH_3CN (pH final 8.0).

A solução contendo $A\beta_{42}$ foram sonicadas e incubadas sem nenhuma agitação por 24h em um instrumento Thermomixer Comfort (Eppendorf Italia, Milão, Italia) em a presença de uleína. A uleína foi dissolvida em metanol para obter a concentração estoque de 50 mM e diluída no tampão do ensaio. Nos experimentos de inibição, a solução estoque foi diluída no

tampão do ensaio até uma concentração final de ensaio correspondente de uleína para A β 42 de 5:1 ([uleine]/[A β 42] =5:1). Um branco contendo somente uleína também foram preparadas e testadas.

Para quantificar a formação das fibrilas amiloides, o método de fluorescência baseado na ThT foi utilizado (Levine, 1993; Naiki et al., 1991). Após a incubação, as amostras foram diluídas para um volume final com um tampão glicina-NaOH (50 mM, pH 8,5) contendo 1,5 μ M de ThT. O sinal de emissão de fluorescência foi monitorado a 490 nm (λ_{exc} = 446 nm). O ensaio foi monitorado por um intervalo de tempo e a intensidade de fluorescência no plateau (~300s) foi obtida após a desconsideração do valor obtido com a solução de 1,5 μ M de ThT e o composto teste. Os valores de intensidade de fluorescência foram comparados e o percentual de inibição devido à presença do inibidor teste foi calculado.

5.4.5. *hrBACE1 Michaelis-Menten com os substratos M-2420 e Substrato IV em solução*

Para determinar as constantes cinéticas da hrBACE1 com o substrato M-2420 para os ensaios enzimáticos em solução, primeiro uma curva de calibração contendo o fragmento de referência do produto de hidrólise do M-2420 (MCA) foi realizada. Resumidamente, 5 μ l de DMSO, 175 μ l uma solução de tampão acetado de sódio 20 mM pH 4.5 contendo CHAPS 0,1% (p/v) e 20 μ l de cinco concentrações de MCA (concentração final 0,3 a 150 nM) em tampão HEPES 10 mM pH 7,5 foram incubados por 60 min a 37°C. O sinal de fluorescência foi mensurado a λ_{exc} = 320 nm (λ_{em} = 405 nm). A concentração de final de DMSO foi mantida abaixo de 5% (v/v) para não interferir na atividade da enzima. Os parâmetros de regressão linear foram obtidos correlacionando os respectivos valores de fluorescência (F) com a concentração de MCA (nM) e assim o valor do coeficiente de correlação (F/nM) obtido.

Posteriormente as constantes de Michaelis-Menten (V_{max} e K_M) foram determinadas a partir do aumento do sinal de fluorescência promovido pela catálise do substrato M-2420

provocado pela hrBACE1 sob as seguintes condições: 5 μ l de DMSO, 175 μ l uma solução de enzima (21.8 nM concentração final) em tampão acetado de sódio 20 mM pH 4.5 contendo CHAPS 0,1% (p/v) e 20 μ l de seis concentrações de M-2420 (concentração final 0.1 a 15 μ M) em tampão HEPES 10 mM pH 7,5 foram incubados por 60 min a 37°C. O sinal de fluorescência foi mensurado a $\lambda_{exc} = 320$ nm ($\lambda_{em} = 405$ nm). A concentração de final de DMSO foi mantida abaixo de 5% (v/v) para não interferir na atividade da enzima. Os valores de velocidades (V_m) para cada concentração de M-2420 foram obtidos (F/min) e transformados em nM/min utilizando o coeficiente de correlação obtido com a curva de calibração do MCA.

Para determinar as constantes cinéticas da hrBACE1 com o Substrato IV para os ensaios enzimáticos em solução, primeiro uma curva de calibração contendo o fragmento de referência do produto de hidrólise do 1,5-EDANS foi realizada. Resumidamente, 5 μ l de DMSO, 175 μ l uma solução de tampão acetado de sódio 20 mM pH 4.5 contendo CHAPS 0,1% (p/v) e 20 μ l de cinco concentrações de 1,5-EDANS (concentração final 0.1 a 1000 nM) em tampão HEPES 10 mM pH 7,5 foram incubados por 60 min a 37°C. O sinal de fluorescência foi mensurado a $\lambda_{exc} = 355$ nm ($\lambda_{em} = 485$ nm). A concentração de final de DMSO foi mantida abaixo de 5% (v/v) para não interferir na atividade da enzima. Os parâmetros de regressão linear foram obtidos correlacionando os respectivos valores de fluorescência (F) com a concentração de 1,5-EDANS (nM) e assim o valor do coeficiente de correlação (F/nM) obtido.

Posteriormente as constantes de Michaelis-Menten (V_{max} e K_M) foram determinadas a partir do aumento do sinal de fluorescência promovido pela catálise do Substrato IV provocado pela hrBACE1 sob as seguintes condições: 5 μ l de DMSO, 175 μ l uma solução de enzima (21.8 nM concentração final) em tampão acetado de sódio 20 mM pH 4.5 contendo CHAPS 0,1% (p/v) e 20 μ l de seis concentrações de Substrato IV (concentração final 0.2 a 5 μ M) em tampão HEPES 10 mM pH 7,5 foram incubados por 60 min a 37°C. O sinal de

fluorescência foi mensurado a $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$ ($\lambda_{em} = 485 \text{ nm}$). A concentração de final de DMSO foi mantida abaixo de 5% (v/v) para não interferir na atividade da enzima. Os valores de velocidades (V_m) para cada concentração de Substrato IV foram obtidos (F/min) e transformados em nM/min utilizando o coeficiente de correlação obtido com a curva de calibração do 1,5-EDANS.

5.5 Ensaio com a enzima hrBACE1 imobilizada

5.5.1. Imobilização da enzima hrBACE1

O disco EDA-CIM[®] foi inserido no Sistema CLAE entre a bomba e o detector e condicionado por 40 min com uma fase móvel contendo tampão fosfato (20 mM, pH 7,0) fluxo 1 ml/min. Depois a fase móvel foi substituída por uma solução de glutaraldeído 10 % (p/v) em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e bombeada por 17 h com fluxo 0,3 ml/ml. O disco EDA-CIM[®] agora ativado foi lavado com uma fase móvel contendo tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) com fluxo 1 ml/min por 30 min.

O disco EDA-CIM[®] foi então removido e colocado em uma proveta de vidro (50 ml) contendo a solução enzimática. A solução enzimática foi preparada pela diluição de uma alíquota de 120 μl de uma solução de hrBACE-1 em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 contendo 125 mM de NaCl (16593,6 U/ml, correspondendo a um total de 1037 U) para um volume final de 1300 μl com tampão fosfato (50 mM, pH 8,0). O disco foi deixado para interagir com a solução enzimática sob leve agitação em uma câmara fria (aproximadamente 4°C por 22h). Uma pequena alíquota de 100 μl da solução contendo hrBACE1 foi deixada em um tubo de microcentrífuga de polipropileno nas proximidades da proveta sob as mesmas condições para a avaliação posterior do rendimento do processo de imobilização.

O disco agora contendo a enzima imobilizada (hrBACE1-IMER) foi inserido em seu invólucro apropriado e conectado novamente ao sistema CLAE. Uma solução de cianoborohidreto de sódio 0,1 M em tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) foi bombeada pelo sistema sob fluxo 0,3 ml/min por 75 min. O disco foi novamente lavado com o tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) e uma solução de monoetanolamina 0,2 M em tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) foi bombeada através do sistema sob fluxo 0,3 ml/min por 90 min. Um disco EDA-CIM[®] branco (sem a enzima) passou pelos mesmos procedimentos e foi utilizado como controle.

Finalmente, o hrBACE1-IMER foi lavado com tampão fosfato (0,1 M, pH 6,0) por 15 min sob fluxo 1 ml/min. O hrBACE1-IMER obtido sempre que não em uso foi armazenado a 4°C em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 6,0) contendo 0,1 % de azida sódica.

5.5.3 Otimização das condições cromatográficas

5.5.3.1. pH da fase móvel

Uma concentração fixa de substrato IV (6 μ M, concentração normalizada) foi injetada em triplicata ao sistema CLAE com fase móvel composta de tampão fosfato 50 mM e pH variando entre 4,0 a 6,0. O fluxo foi mantido a 1,0 ml/min. A área relacionada ao pico do produto de hidrólise do substrato foi integrada e comparada para cada pH da fase móvel.

5.5.3.2. Fluxo

Uma concentração fixa de substrato IV (6 μ M, concentração normalizada) foi injetada em triplicata ao sistema CLAE com fase móvel composta de tampão fosfato 50 mM e pH 5,0.

O fluxo foi modificado entre 0,3 a 2,0 ml/min. A área relacionada ao pico do produto de hidrólise do substrato foi integrada e comparada para fluxo utilizado.

5.5.4. Estabilidade do hrBACE1-IMER

A estabilidade do hrBACE1-IMER foi avaliada utilizando uma fase móvel tampão acetado de sódio 50 mM contendo CHAPS (0,1 %, p/v) e DMSO na proporção volumétrica 95/5 (v/v) e injetando diariamente 10 µl de uma solução de M-2420 (2 µM, concentração normalizada) sob as condições otimizadas previamente (pH 5.5, fluxo 1.0 ml/min) Mancini e colaboradores (Mancini and Andrisano, 2010; Mancini et al., 2007). A área do pico resultante da hidrólise do substrato foi integrada e plotada de acordo com o respectivo valor de tempo.

5.5.5. hrBACE1-IMER Michaelis-Menten para o substrato M-2420

A atividade do hrBACE1-IMER foi determinada utilizando M-2420 como substrato e analisando a quantidade do produto de hidrólise obtido após a injeção de 10 ml de concentrações crescentes de M-2420 (0,03 a 2,35 µM, valores normalizados) e monitorado a $\lambda = 420$ nm ($\lambda_{exc} = 320$ nm) sob as condições otimizadas previamente Mancini e colaboradores (Mancini and Andrisano, 2010; Mancini et al., 2007).

A fase móvel consistia em uma mistura composta por tampão acetato de sódio 50 mM contendo 0,1 % CHAPS (p/v) pH 5,5 e DMSO 5 % (v/v), fluxo 1,0 ml/min e o volume de injeção 10 µl. Todas as análises cromatográficas realizadas no hrBACE1-IMER foram executadas em temperatura controlada ($37 \pm 1^\circ\text{C}$).

A concentração normalizada do substrato foi calculada pela equação a seguir (3):

$$[\text{Substrato}]_{\text{normalizada}} = \frac{C_{inj} \times V_{inj}}{VM}$$

Aonde C_{inj} é a concentração injetada de substrato, V_{inj} é o volume injetado e VM é o volume morto do hrBACE1-IMER.

A área do produto foi relacionada para cada concentração do substrato correspondente. Cada concentração de substrato foi analisada em duplicada. Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos a partir da análise dos dados utilizando o programa GraphPad Prism.

Para avaliar a quantidade do produto de hidrólise obtido (MCA) a partir da catalise enzimática do substrato M-2420 pelo hrBACE1-IMER soluções de concentrações crescentes de MCA (0.16- 2.46 nM, concentração normalizada) foram injetadas ao sistema e uma curva de calibração foi construída.

5.5.6 hrBACE1-IMER Michaelis-Menten para o substrato IV

Para caracterizar os parâmetros cinéticos do Substrato IV no hrBACE1-IMER, uma curva de calibração foi obtida utilizando o seu produto de hidrólise de referência (1,5-EDANS). Soluções de concentrações crescentes de 1,5-EDANS (0,12-29,0 nM, concentração normalizada) foram injetadas no sistema (10 μ l) sob fluxo de 1,0 ml/min e uma solução composta por tampão fosfato 50 mM pH 5,0 como fase móvel. As concentrações normalizadas foram calculadas conforme a equação (3).

A área de cada pico foi detectada em 490 nm ($\lambda_{exc}=355$ nm) e os valores correlacionados com cada concentração de 1,5-EDANS injetado. Os parâmetros de regressão linear foram obtidos correlacionando os respectivos valores de área com a concentração de 1,5-EDANS (nM) e assim o valor do coeficiente de correlação (F/nM) obtido.

Posteriormente as constantes de Michaelis-Menten (V_{max} e K_M) foram determinadas a partir do aumento da área do pico do produto obtido promovido pela catálise do Substrato IV provocado pelo hrBACE1-IMER sob as seguintes condições: 10 μ l de diferentes

concentrações normalizadas de Substrato-IV foram injetados (0.4 a 7.3 μM) no sistema sob fluxo 1,0 ml/min utilizando uma solução de tampão fosfato 50 mM pH 5,0 como fase móvel. A área de cada pico foi monitorada a $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$). As áreas dos produtos de hidrólise obtidas foram convertidas em concentração (nM) através do coeficiente de correlação obtido a partir da curva de calibração. A taxa da reação (nM/min) foi derivada correlacionando os valores de concentração obtidos pelo tempo de contato (0,34 min). A partir do gráfico de Michalis-Menten as constantes cinéticas foram obtidas.

Devido à instabilidade do substrato IV, todas as soluções também foram injetadas em um disco de EDA-CIM[®] para avaliar qualquer contribuição devido a sua hidrólise espontânea. As áreas do pico obtidas a partir da hidrólise espontânea foram subtraídas daquelas obtidas pela hidrólise enzimática. Além disso, é importante a utilização de soluções recém-preparadas de Substrato IV, armazená-las em baixa temperatura e protegidas da luz.

5.5.7. Ensaio de inibição no hrBACE1-IMER

Para validar o uso do substrato IV para a determinação do potencial inibitório de novos compostos, o valor de IC_{50} de inibidores conhecidos da hrBACE1 como o inibidor IV (**7**) foi determinado. Uma solução estoque do inibidor (10 mM) foi preparada em DMSO. Cinco concentrações crescentes do inibidor foram preparadas pela diluição da solução estoque em uma mistura de DMSO:fase móvel (50% DMSO v/v) e cada concentração misturada com uma concentração fixa de Substrato IV (3 μM , concentração normalizada) para obter uma inibição da atividade da hrBACE1 entre 10 e 70 %. Aliquotas de 10 μl foram injetadas em duplicata no sistema sob fluxo 1,0 ml/min utilizando uma solução de tampão fosfato 50 mM pH 5,0 como fase móvel e as áreas de cada pico monitoradas em $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$). O percentual de inibição devido a presença do composto em concentrações crescentes foi calculado de acordo com a seguinte expressão: $100 - (A_i/A_0 \times$

100), onde A1 e A0 são as áreas dos picos na presença e na ausência do inibidor, respectivamente. As curvas de inibição foram obtidas para o composto teste plotando o % de inibição pelo logaritmo da concentração do inibidor. Os parâmetros de regressão linear foram determinados e o valor de IC₅₀ extrapolado.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando o substrato M02420. As mesmas concentrações de inibidor foram injetadas juntamente com uma concentração fixa de substrato (1,76 nM, concentração normalizada) sob as condições cromatográficas descritas previamente fase móvel tampão acetato de sódio 50 mM contendo 0,1 % CHAPS (p/v) pH 5,5 e DMSO 5 % (v/v), fluxo 1,0 ml/min. As áreas dos picos foram obtidas $\lambda = 420$ nm ($\lambda_{exc} = 320$ nm) e o percentual de inibição devido a presença do composto em concentrações crescentes foi calculado de acordo com a seguinte expressão: $100 - (A_i/A_0 \times 100)$, onde A1 e A0 são as áreas dos picos na presença e na ausência do inibidor, respectivamente. As curvas de inibição foram obtidas para o composto teste plotando o % de inibição pelo logaritmo da concentração do inibidor. Os parâmetros de regressão linear foram determinados e o valor de IC₅₀ extrapolado.

5.5.8. IC₅₀ da uleína no hrBACE1-IMER

Para determinar o valor de IC₅₀ da uleína no BACE1-IMER alíquotas de 10 μ l de uma solução contendo 6 μ M de Substrato IV e 0,18 μ M de uleína (concentrações normalizadas) foram injetadas no sistema cromatográfico em duplicata e a área dos picos relativos foram determinadas após a subtração dos valores obtidos a partir da mesma injeção no disco EDA-CIM sem a enzima. O valor de IC₅₀ foi calculado a partir da fórmula (4):

$$IC_{50} = [I](100/\% \text{ inibição} - 1)$$

aonde $[I]$ é a concentração do inibidor e % inibição é o valor correspondente observado (Kornacker et al., 2005).

6. Resultados e discussão

A DA é uma doença multifatorial caracterizada por alterações em diferentes vias celulares e perda neuronal. Em particular, várias hipóteses foram formuladas para correlacionar as lesões patológicas e neurológicas com a etiologia desta doença. As mais importantes estão relacionadas com a perda dos neurônios colinérgicos e com a presença do peptídeo beta-amiloide (A β). Com base nessas premissas, uma droga capaz de interagir simultaneamente com estes importantes alvos, pode ser considerada um agente terapêutico eficaz capaz de enfrentar as causas desta patologia e não atuar somente como uma droga paliativa (Minarini et al., 2012).

Portanto, o potencial do alcaloide uleína (**31**) foi avaliado contra as enzimas alvo e o peptídeo A β , todos os alvos validados relacionados com a DA.

6.2. Inibição da AChE e BChE pela uleína

No ensaio de inibição das enzimas colinesterases a uleína foi capaz de inibir ambas as enzimas AChE e BChE em valores μ M. Os ensaios foram baseados no método de Ellman, um ensaio fotométrico para a determinação da atividade colinesterásica onde a atividade da enzima é medida de acordo com o aumento da produção da cor amarela a partir da reação da tiocolina com o íon ditiobisnitrobenzoato, popularmente conhecido como reagente de Ellman, após a hidrólise do substrato acetiltiocolina ou butiriltiocolina pelas enzimas AChE ou BChE respectivamente gerando acetato e tiocolina como produtos da reação. Um esquema da reação pode ser visto no esquema 1 (Ellman et al., 1961).

colinesterásico. Atualmente seu uso é extremamente limitado devido ao número de efeitos colaterais hepáticos e aumento dos níveis de transaminase que podem alcançar relevância clínica (Racchi et al., 2004, Viegas, 2005 #114).

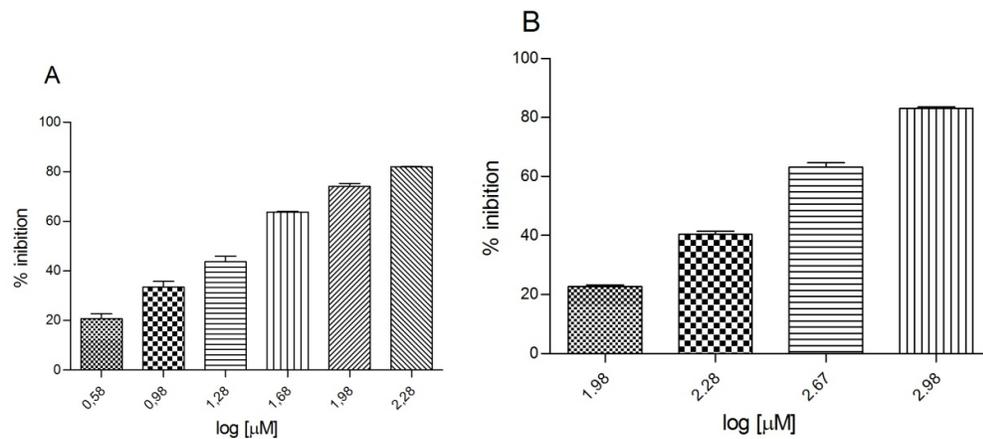


Figura 9. Atividade inibitória dose-dependente da oleína contra (A) butirilcolinesterase e (B) acetilcolinesterase. Os resultados são a média \pm SEM obtidos a partir de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

Tabela 1

Inibição da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase pela oleína

Ensaio	Acetilcolinesterase [μM]	Butirilcolinesterase [μM]
Uleína	279 \pm 4.5	24 \pm 1.5
Tacrina	0.34 \pm 0.03	0.02 \pm 0.06

Os valores são a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata \pm SEM.

A inibição simultânea de ambas as colinesterases pode ser útil para aumentar os níveis no neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica nas formas severas da DA onde acredita-se que a enzima BChE possa desempenhar um papel compensatório na hidrólise da ACh seguida da perda maciça dos neurônios colinérgicos. Uma vez que os níveis de AChE em determinadas áreas do cérebro decrescem progressivamente com o avanço da patologia da doença devido a diminuição dos neurônios colinérgicos, os níveis de BChE associados com as células glia e plasma se mantêm inalterados. Consequentemente, inibidores de ambas as

colinesterases podem apresentar uma melhor eficácia no tratamento da DA na sua forma moderada e avançada (Greig et al., 2005).

Embora o potencial anticolinesterásico apresentado pela uleína seja relativamente modesto, cabe ressaltar que quando conexões existem entre dois ou mais alvos, como aparenta ser o caso da DA, espera-se que compostos que são capazes de interagir com mais de um alvo com atividades moderadas produzam efeitos *in vivo* superiores do que aqueles com elevada afinidade para um único alvo (Bolognesi et al., 2011a).

Os alcaloides sempre foram uma classe de compostos naturais com um potencial surpreendente para o desenvolvimento de inibidores colinesterásicos e, provavelmente são o maior grupo de metabólitos secundários com atividade inibitória em concentrações baixas devido as suas estruturas contendo um nitrogênio. Um dos sítios de ligação da AChE envolve a interação com o nitrogênio carregado positivamente. Entretanto existem outros sítios de ligação o que permite a inibição da enzima por compostos não-alcaloides, principalmente terpenos, xantonas e cumarinas (Konrath et al., 2013b; Mukherjee et al., 2007; Pinho et al., 2013). Poucos compostos naturais alcançaram o nível de ensaios clínicos para o tratamento da DA e eventualmente alcançaram o mercado, dentre eles a galantamina (**4**), isolada dos bulbos de *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae), e a rivastigmina (**4**), são dois inibidores colinesterásicos derivados de produtos naturais comercializados atualmente para aliviar os sintomas da DA. Além disso, o composto huperzina A (**9**), um alcaloide sesquiterpeno isolado de *Huperzia serrate*, Lycopodiaceae, um potente inibidor reversível da AChE está atualmente sofrendo ensaios clínicos (Drtinova and Pohanka, 2013).

Embora o enorme interesse nestas substâncias tenha inspirado o desenvolvimento da química medicinal, levando a síntese de muitos análogos mais potentes, é muito difícil encontrar dados na literatura que possam ser utilizados com segurança para comparar a potência entre este grupo de metabólitos considerando suas atividades colinesterásicas. Essa dificuldade pode estar relacionada com as diferenças estruturais entre as isoformas das

enzimas utilizadas nos ensaios de inibição e, acima de tudo, nas condições do ensaio. Por exemplo, o donepezila (**2**) em uma das referências consultadas apresentou valores de IC₅₀ para as enzimas AChE e BChE 0,03 μM e 7,95 μM respectivamente utilizando a enzima AChE de peixe elétrico e a enzima BChE de soro equino (Yoon et al., 2013). Enquanto isso, Kurek e colaboradores descreveram para a mesma substância e as mesmas enzimas com o mesmo ensaio de Ellman, valores de IC₅₀ de 0.601x10⁻⁵ μM e 3.44x10⁻⁵ μM, respectivamente (Zurek et al., 2013).

Em outro trabalho (Seidl et al., 2010) a uleína foi avaliada com relação a sua atividade anticolinesterásica utilizando a enzima AChE de peixe elétrico e um valor de IC₅₀ de 45 μM foi obtido. Este valor é cerca de sete vezes mais ativo do que aquele obtido aqui com a isoforma recombinante humana da enzima. A razão para esta seletividade pode também estar relacionada com algumas diferenças entre essas duas isoformas. Enquanto que a isoforma de peixe elétrico é um tetrâmero flexível (Bourne et al., 1999), o que facilita a interação enzima-ligante, a estrutura cristalina da isoforma recombinante da enzima humana em geral apesar de ser similar a isoforma de peixe elétrico, apresenta uma sequência de peptídeos que bloqueia o acesso ao sítio ativo dificultando assim o acesso do inibidor (Dvir et al., 2010).

Foi também já descrito que algumas drogas utilizadas para o tratamento da DA como a donepezila se ligam de maneira diferente entre a isoforma humana e a de peixe elétrico, exemplificando como a enzima humana é melhor para estudos de inibição mais precisos (Cheung et al., 2012).

Como já foi descrito anteriormente, a maioria das revisões relacionadas com os alcaloides e suas atividades anticolinesterásicas descrevem somente os resultados obtidos para cada composto, porém não relacionam os resultados obtidos com as condições em que esse ensaio foi realizado. Este fato contribui para gerar uma discussão muito relevante considerando a potencia dos compostos analisados utilizando ensaios enzimáticos básicos no

início do processo da descoberta de novos fármacos. Uma vez que o ensaio de Ellman é o método de análise de escolha para detectar a atividade anticolinesterásica e existem tantas variáveis importantes capazes de influenciar o resultado final, como a classificação de um composto pode ser melhor determinada e como esse resultado pode refletir verdadeiramente o seu potencial inibitório quando comparado com outros compostos já testados? Estas questões demonstraram ser muito pertinentes quando tentamos comparar a atividade da uleína com outros compostos. Já foi descrito aqui a importância do ensaio realizados com a isoforma humana da enzima AChE, contudo, encontrar na literatura um alcaloide que foi analisado utilizando a mesma enzima utilizada no ensaio com a uleína foi uma tarefa árdua. A maioria dos alcaloides testados foram analisados utilizando as isoformas de peixe elétrico da AChE e as isoformas de soro equino e bovino da BChE e, além disso, a maioria dos ensaios foi realizada somente com a enzima AChE. Outro detalhe importante é que os resultados são na maioria das vezes expressos somente em termos de valores de IC_{50} , um valor que depende da concentração da enzima, do inibidor e do substrato juntamente com as condições experimentais. Seria necessário uma determinação precisa do valor da constante de inibição K_i , uma quantidade intrínseca, termodinâmica que independente do substrato, porém dependente da concentração de enzima e inibidor. Portanto, a comparação poderia ser realizada de uma maneira melhor entre diferentes laboratórios para a caracterização de inibidores. Enquanto que os ensaios para determinar os valores de IC_{50} , mesmo mais demorados, são geralmente preferidos e realizados com os candidatos mais promissores, uma estimativa precisa e inicial dos valores de K_i seria mais benéfica (Cer et al., 2009).

Além de ser a principal enzima responsável pela metabolização da acetilcolina, a acetilcolinesterase é também responsável pela modulação do fluxo sanguíneo cerebral, agregação do peptídeo beta amiloide, ativação e expressão da proteína APP95, fosforilação da proteína tau e influencia processos inflamatórios. Tem a capacidade de interagir com o

peptídeo β -amiloide, levando a formação de complexos estáveis e a formação das placas amiloides (Badja et al., 2013; Inestrosa et al., 1996).

Portanto, existe ainda um grande interesse para a descoberta de novos inibidores colinesterásicos a partir de fontes naturais uma vez que os inibidores atualmente disponíveis possuem aplicações clínicas limitadas devido a seu curto tempo de meia-vida e efeitos colaterais indesejados como hepatotoxicidade e distúrbios gastrointestinais.

6.2. Avaliação cinética da inibição da enzima eelAChE pela uleína

Para melhor compreender o mecanismo de inibição da uleína contra a enzima AChE, a análise cinética foi realizada para determinar a sua constante de inibição K_i e o mecanismo de ação (Figura 10). O tipo de inibição foi elucidado a partir da análise do gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk que apresentou aumento dos valores do coeficiente de correlação (menor V_{max}) e pontos de intercepção um pouco maiores (maior K_m) com o aumento da concentração do inibidor. Na análise do gráfico (Figura 10) podemos observar que os pontos referentes a diferentes concentrações quase se interceptam no eixo x. Isto sugere um mecanismo de inibição do tipo misto e o valor de K_i estimado foi de 27,67 μM .

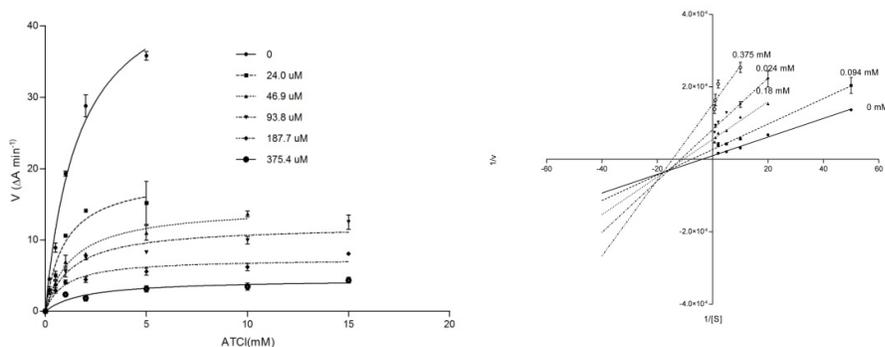


Figura 10. Michaelis-Menten e estado de inibição estacionário da AChE pela uleína. O gráfico do duplo recíproco Lineweaver-Burk dos valores das velocidades iniciais e concentração do substrato ACh (0 - 1.5 mM) estão apresentados.

Inibidores do tipo misto referem-se aos casos aonde o inibidor possui afinidade de ligação tanto para a enzima livre como para o complexo enzima-substrato. Este tipo de inibidor não compete com o substrato pelo sítio ativo livre da enzima e, portanto, se liga a enzima por um sítio ativo diferente do sítio ativo conhecido e o sítio periférico. Devido a este fator a inibição não consegue ser superada pelo aumento da concentração de substrato (Copeland, 2000 1334). Algumas vezes o termo “não-competitivo” é utilizado inconsistentemente. Este termo é geralmente utilizado da mesma maneira como definido acima, quando o inibidor possui afinidade de ligação idêntica para a enzima livre e para o complexo enzima-substrato. Entretanto, erroneamente, o termo “não-competitivo” é usado mais frequentemente quando as duas afinidades de ligação diferem, o que é mais correto chamar de modelo misto de inibição.

Recentemente, a hipótese colinérgica sofreu uma reestruturação e novamente se tornou foco de pesquisas. Descobriu-se que a enzima AChE possui um papel adicional além de sua função clássica de terminar o impulso colinérgico (Silman and Sussman, 2005). Dentre as funções não-clássicas da AChE, destaca-se a sua influência no aparecimento das placas amiloides, atuando como moléculas *chaperonas* patológicas, ou seja, a enzima se liga a forma não-amiloidogênica do A β induzindo a transição conformacional para a sua conformação amiloidogênica e posterior agregação em fibrilas amiloides. A enzima AChE promove diretamente a organização de A β em fibrilas amiloides *in vitro* formando complexos estáveis AChE- A β . Análises estruturais realizadas por cristalografia de raios-x e ensaios de inibição com inibidores da AChE identificaram claramente o sítio aniônico periférico como sendo o local de interação da enzima e A β . Portanto, inibidores capazes de interagir com o sítio ativo da enzima AChE e também com seu sítio periférico podem atuar não somente nos déficit colinérgico presente na DA mas também modificar a evolução da doença (Bolognesi et al., 2009b).

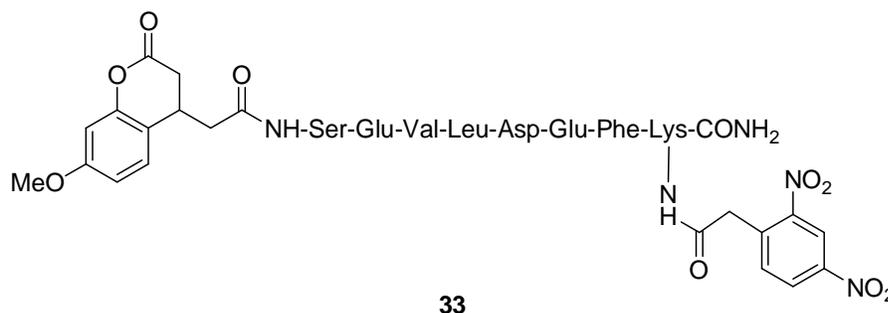
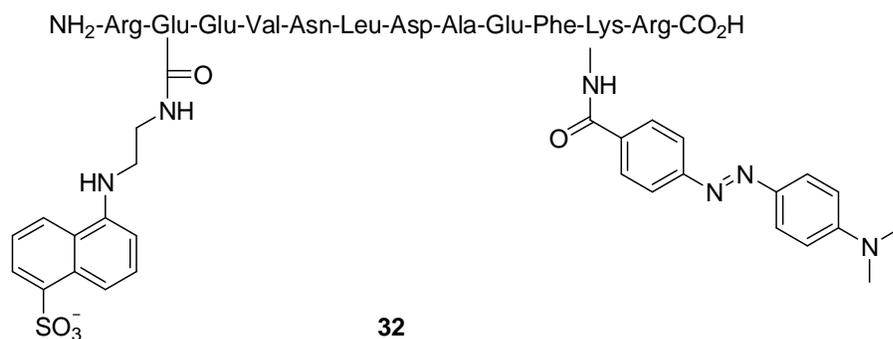
6.3. Inibição da beta secretase pela uleína

A agregação e a formação de fibrilas do peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) são eventos centrais relacionados com a patogênese e progressão da doença de Alzheimer (Naslund et al., 2000; Selkoe, 2001). Portanto a capacidade da uleína de inibir a enzima chave (β -secretase) responsável pela geração de $A\beta$ a partir da proteína precursora amiloide (APP) bem como a sua capacidade de inibir a agregação espontânea do $A\beta$ foram avaliadas.

O ensaio para avaliar a inibição da enzima β -secretase está baseado nos princípios de transferência da energia de ressonância de fluorescência (FRET) (Kennedy et al., 2003). O substrato FRET consiste em um doador de fluorescência ligado por uma cadeia peptídica a um acceptor capaz de extinguir a fluorescência do doador pela transferência da energia de ressonância de fluorescência. Uma vez clivado pela hrBACE1, o quantum do doador é restaurado e a atividade enzimática pode ser relacionada linearmente com o aumento da fluorescência (Mancini et al., 2011).

Até o presente momento não foi definido nenhum substrato peptídico FRET para os ensaios de inibição da BACE1 uma vez que a enzima possui uma seletividade para o substrato relativamente baixa devido à presença de um sítio ativo que se encontra aberto e acessível a macromoléculas que possuam diferentes entidades químicas (Sauder et al., 2000). A escolha do melhor substrato é determinada por muitos fatores que influenciam o desempenho do ensaio como a constante de clivagem, o intervalo de concentração, a eficiência de *quenching*, o sinal de ruído e o limite de detecção da atividade da BACE1 (Mancini et al., 2011).

Para o ensaio, o substrato peptídico comercial ácido 4-(4-dimetilaminofenilazo) benzoico/ ácido 5-[(2-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfônico (DABCYL/1,5-EDANS) conhecido como Substrato IV (**32**) foi utilizado em detrimento do substrato peptídico metoxicumarínico usado mais frequentemente (M-2420, **33**).



Ambos os substratos possuem a sequência Suíça mutada da APP (Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe), o fluoróforo e o quencher localizado nas posições *N*- e *C*- terminais de um hexapeptídeo respectivamente. Entretanto, os substratos FRET geralmente possuem um par de doador-aceptor com pequenas bandas de Stoke e intervalos de comprimentos de onda de excitação e emissão que se sobrepõem a muitos dos sinais dos compostos de interesse. Um substrato ótimo pode ser escolhido considerando alguns aspectos críticos. Um ponto importante é a escolha de bandas de Stoke largas e comprimentos de onda de emissão com tempo de meia-vida muito maior do que aquele do composto teste. Considerando estes aspectos, o Substrato IV foi o substrato escolhido, pois é caracterizado por maiores comprimentos de onda de absorção e emissão do que o M-2420.

Outro aspecto importante do ensaio é a sensibilidade a qual é definida pela razão de ΔF pela concentração do substrato e reflete a taxa de conversão do substrato e a intensidade do sinal de fluorescência após a hidrólise do substrato. Um sinal de emissão

elevado é típico para um ensaio sensível aonde baixas concentrações de enzima e substratos podem ser empregadas. A taxa de conversão do substrato depende do tamanho e da natureza da sequência de aminoácidos presente no substrato. O substrato IV possui uma cadeia de 12 aminoácidos enquanto que o M-2420 possui uma sequência de 10 aminoácidos derivados do sítio Suíço mutado da APP capaz de ser reconhecido pela BACE1. O tamanho da cadeia peptídica é essencial uma vez que a eficiência de *quenching* é reduzida com o aumento da cadeia peptídica (Mancini et al., 2011).

A elevada sensibilidade do ensaio também depende da presença de um fluoróforo com um alto rendimento de fluorescência e um par de doador-receptor com uma transferência de energia de ressonância adequada. Um alto sinal de emissão é desejado para uma baixa concentração de substrato para melhor caracterizar o potencial inibitório, utilizando menores concentrações de enzima. Neste contexto, o substrato M-2420 apresenta maior vantagem uma vez que o par doador-aceptor (7-metoxicumarin-4-il) (MCA) e o dinitro-feinil (DNP) combinam uma boa eficiência de quenching melhor do que o par ácido 4-(4-dimetilaminofenilazo) benzoico (DABCYL) e ácido 5-[(2-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfônico (1,5-EDANS) o que ocasiona uma sensibilidade limitada devido a baixa intensidade de fluorescência do grupo DABCYL (Mancini et al., 2011).

Estes fatores combinados explicam a necessidade de uma concentração mais baixa de enzima necessária para o ensaio de inibição da BACE1 utilizando o substrato IV. Uma vez que não era possível aumentar a concentração de substrato visando manter a concentração de DMSO abaixo de 5 % para preservar a atividade enzimática, foi necessário diminuir a concentração da enzima devido à baixa sensibilidade do substrato IV (Ermolieff et al., 2000).

A solubilidade do substrato é outro fator que deve ser considerado e geralmente restringe a concentração do substrato abaixo dos valores de K_M limitando assim a intensidade de fluorescência. Dentro deste contexto o substrato IV apresenta vantagem sobre o M-2420

uma vez que é bastante solúvel em água uma vez que é um sal sódico (Mancini et al., 2011).

Embora o Substrato IV não seja o substrato de escolha para os ensaios de inibição com a enzima BACE1, nem apresenta as melhores características, possui uma vantagem essencial sobre o substrato M-2420 o que o fez ter sido o substrato escolhido neste estudo. O último não pode ser aplicado quando se deseja analisar compostos aromáticos ou heterocíclicos principalmente de fontes naturais uma vez que estes apresentam fluorescência espontânea no mesmo intervalo utilizado para a detecção da atividade enzimática utilizando o substrato M-2420 (Mancini et al., 2011).

A interferência do sinal de fluorescência espontânea da uleína e da atividade da BACE1 com o substrato M-2420 pode ser observado na Figura 11, e portanto, justifica a escolha do substrato IV para os ensaios de inibição.

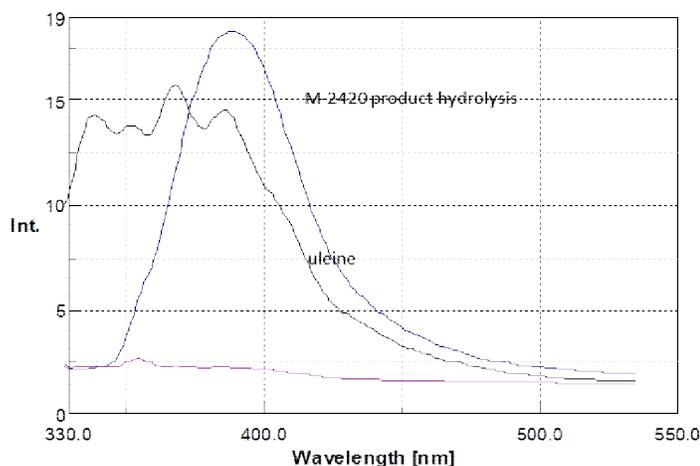


Figura 11. Espectro de emissão de fluorescência sobrepostos ($\lambda_{exc}=320$ nm) do produto da hidrólise enzimática do substrato M2420 pela BACE1 e a solução uleína (0.05 mM).

No ensaio de inibição da enzima β -secretase a uleína apresentou uma potente capacidade de inibição dose-dependente com valor de IC_{50} em intervalo submicromolar (IC_{50} 180 ± 22 nM). No mesmo ensaio, a uleína foi somente 10 vezes menos ativa do que potente inibidor peptídico chamado inibidor IV (**7**) (Tabela 2).

Tabela 2

Inibição da BACE1 e agregação espontânea do A β 42 pela uleína e compostos de referência.

Composto	IC ₅₀ ^a (nM) hrBACE1	% Inibição da agregação espontânea de A β 42 ^b
Uleína	180 \pm 22	40.1 \pm 7.4 ^c
Inibidor IV	19.3 \pm 2.7	–
Curcumina ^d	–	34.4 \pm 1.1 ^d

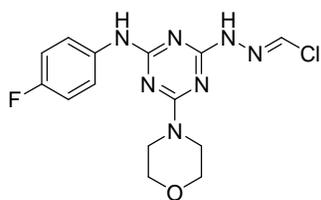
^a quatro concentrações diferentes de inibidores foram testadas. Valores de IC₅₀ são a média de quatro experimentos independentes e cada experimento realizado em duplicata (\pm) SEM.

^b percentual de inibição da agregação espontânea de 50 μ M A β 42 por 250 μ M de uleína

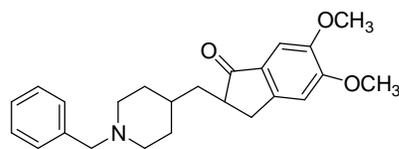
^c 10 μ M do composto de referência. ^d de (Bolognesi et al., 2007b).

Valores são a média de dois experimentos independentes e cada experimento realizado em duplicata (\pm) SEM.

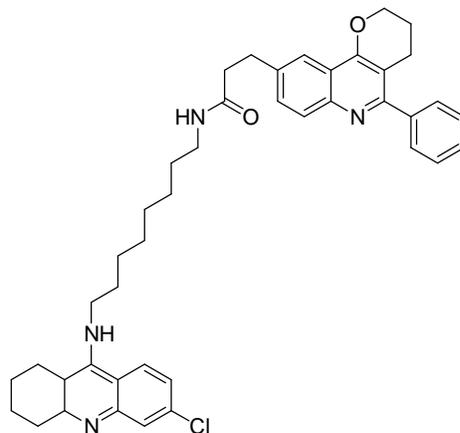
A uleína pode ser capaz de interferir com a produção do A β pela potente inibição observada da enzima amiloidogênica BACE1. Atualmente, existe um grande interesse na descoberta de novos inibidores da BACE1 não peptídicos capazes de apresentar uma melhor biodisponibilidade oral e habilidade para atravessar a barreira hematoencefálica uma vez que a enzima se encontra principalmente no cérebro (Bennett et al., 2000). Em uma revisão publicada por Mancini e colaboradores (2011) (Mancini et al., 2011) foram relacionados que entre os inibidores já testados, somente três compostos foram testados com a mesma enzima utilizada em nosso ensaio: 4-((*E*)-2-(clorometileno)hidrazinil)-*N*-(4-fluorofenil)-6-morflino-1,3,5-triazin-2-amina (**34**) (Huang et al., 2006), 2-((1-benzilpiperidin-4-il)metil)-2,3-dihidro-5,6-dimetoxinden-1-ona (**35**) (Mancini et al., 2007) e *N*-(8-(3-cloro-5,6,7,8,8a,10a-hexahidroacridin-9-ilamino) octil)-3-(3,4-dihidro-5-fenil-2H-pirano[3,2-*c*]quinolin-9-yl)propanamida (**36**) (Camps et al., 2009) porém, somente o último composto apresentou potencial inibitório mais próximo ao demonstrado pela uleína (IC₅₀ 1,8 μ M) ainda assim, a uleína ainda é dez vezes mais ativa. Entre os outros onze inibidores não-peptídicos descritos testados com outras fontes de enzima, os valores de IC₅₀ se encontravam em um intervalo entre 0,011 a 27,85 μ M sendo que cinco foram mais ativos do que a uleína (0.011 - 0.17 μ M).



34



35

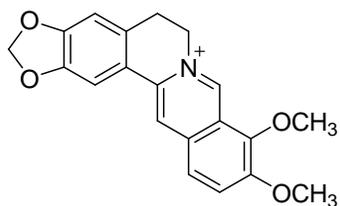


36

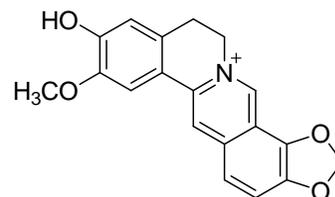
Recentemente em uma revisão publicada por Natarajan e colaboradores (2013) e Orhan (2012) (Natarajan et al., 2013; Orhan, 2012), poucas pesquisas foram realizadas com alcaloides de fontes naturais e somente alguns poucos foram reportados como inibidores da BACE1, embora se conheça um grande número de compostos sintéticos do tipo alcaloide capazes de inibir a enzima. Alguns alcaloides como *epi*-berberina (**37**) e groenlandina (**38**) (Jung et al., 2009), dois alcaloides protoberberinas dos rizomas de *Coptis chinensis* Franch., Ranunculaceae, ou nerferina (**39**), um alcaloide isoquinólico isolado dos embriões das sementes de *Nelumbo nucifera* Gaern., Nelumbonaceae (Jung et al., 2010), ou ainda dois biflavonoides do tipo amentoflavonas, 2,3-dihidroamentoflavona isolados de *Cycasrevoluta* e 2,3-dihidro-6-metilginkgetina de *Cephalotaxusharringtonia* var. *fastigiata* (Orhan, 2012; Sasaki et al., 2010; Williams et al., 2011) foram capazes de inibir a enzima BACE1, porém nenhum apresentou tão significativa como a aquela do alcaloide uleína. Em particular, a groenlandicina além de inibir a enzima β -secretase diminuindo a produção de A β também

possui potente efeito inibitório contra a AChE e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Park, 2010).

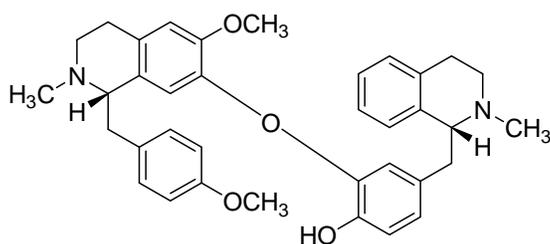
Além disso, vale a pena mencionar que até Julho de 2010 somente 49 inibidores da BACE1 com valores de IC_{50} abaixo de 100 μM foram descritos e, entre eles somente três apresentaram IC_{50} abaixo de 1 μM [bastadina 9 (**28**), luteolina (**40**) e neocorilina (**41**)] (Williams et al., 2011), o que torna a atividade nM apresentada pela uleína ainda mais significativa. Mais interessante, a uleína é uma estrutura não-peptídica de baixo peso molecular (266) o que pode possuir um valor adicional considerando uma possível habilidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Bennett et al., 2000).



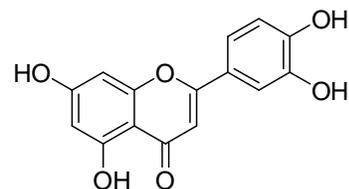
37



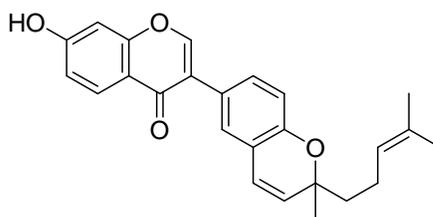
38



39



40



41

6.4. Inibição da agregação espontânea do peptídeo beta-amiloide

O ensaio de inibição da agregação espontânea do peptídeo beta-amiloide (1-42) foi baseado no ensaio fluorimétrico com a tioflavina T (ThT) (Bartolini et al., 2007a). Neste ensaio, as amostras pré-tratadas de A β 42 (50 μ M) foram incubadas a 30°C por 24 h na presença e na ausência de uleína (250 μ M). Após o período de incubação, as amostras foram diluídas com uma solução contendo a ThT e uma varredura por tempo foi realizada (λ_{exc} = 446 nm; λ_{em} = 490 nm) (Figura 12). Os valores no plateau (300 s) foram obtidos e descontados os valores de ruído do sinal de fluorescência. As intensidades de fluorescência foram comparadas e o percentual de inibição devido a presença da uleína foi calculada (Tabela 2).

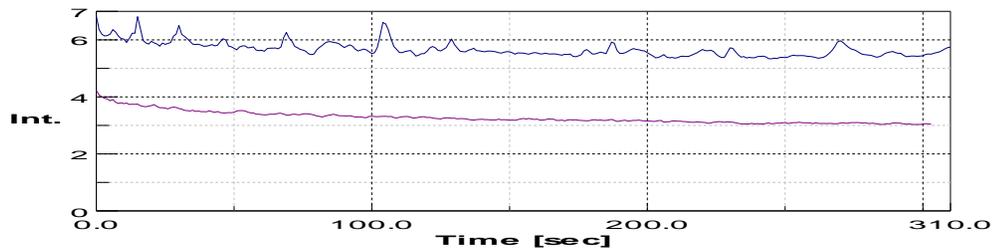


Figura 12. Varredura por tempo da agregação espontânea do A β 42 (50 mM) na ausência (linha superior) e na presença (linha inferior) de uleína (250 mM). O sinal de fluorescência foi monitorado por um intervalo de tempos (300 s) em λ_{exc} = 446 nm; λ_{em} = 490 nm.

A formação do monômero é um ponto de partida bem aceito para o processo de agregação do peptídeo amiloide, uma amostra inicial conformacionalmente homogênea de A β 42 é um pré-requisito para um processo de polimerização reprodutível. Portanto, o A β 42 foi inicialmente tratado com o hexafluoropropanol para induzir a prevalência de uma estrutura totalmente na sua forma de α -hélice (Bartolini et al., 2011). Este é um importante passo para garantir a reprodução do processo de polimerização juntamente com um controle adequado da interferência da amostra mais ThT através da realização de um controle-

branco. Um ensaio de agregação reprodutível capaz de oferecer um grande número de informações é um pré-requisito para a caracterização confiável de novos inibidores do processo de agregação amiloide. Deve ser enfatizado que a maioria dos compostos já analisados e presentes na literatura para esta atividade foram investigados por seus efeitos gerais no processo de agregação ao invés de seus modos de interação com espécies pré-fibrilares específicas incluindo um grande número de ensaios em cultivo celular (Byun et al., 2008; Durairajan et al., 2008; Irie and Keung, 2003; Iuvone et al., 2006; Ono et al., 2004).

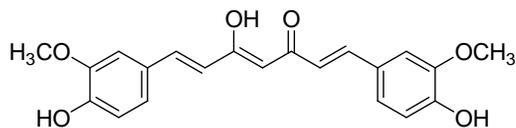
Embora o ensaio baseado na fluorescência da ThT seja o método mais utilizado, deve ser realizado concomitantemente com um controle-branco para descartar uma possível interferência de compostos naturalmente fluorescentes e/ou competição pelo mesmo sítio de ligação nos oligômeros/fibrilas capazes de provocar falsos resultados (Bartolini et al., 2011).

Para uma abordagem de high-throughput screening (HTS), o ensaio ThT é uma técnica quantitativa adequada por possibilitar a avaliação de um elevado número de novos compostos e a seleção daqueles mais ativos. A seletividade da ThT para as fibrilas sugere que compostos positivos a partir deste ensaio possam interferir com a formação das fibrilas, porém não fornece nenhuma informação sobre quais das espécies de A β o composto pode interagir (Bartolini et al., 2011).

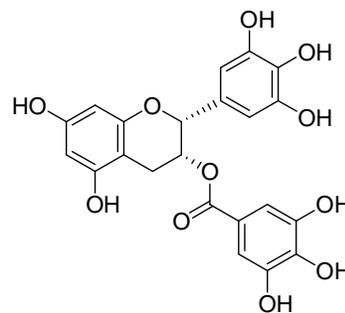
A uleína foi capaz de atuar como um agente anti-agregante inibindo em 40,1 % a agregação espontânea no A β 42 a 250 μ M, a forma mais neurotóxica dos peptídeos amiloides presentes na DA. Embora uma variedade de moléculas derivadas de plantas já tenham sido avaliadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* para efeitos similares, somente dois alcaloides naturais foram capazes de afetar diretamente a agregação de A β : nicotina (**29**) e melatonina (**30**) (Williams et al., 2011). A nicotina foi capaz de reduzir significativamente os níveis das placas amiloides em camundongos transgênicos, porém, outros estudos *in vivo* também sugerem que a nicotina também contribui para aumentar a agregação e a fosforilação da tau o que poderia provocar efeitos não desejados (Oddo et al., 2005). A melatonina é um

alcaloide com propriedades anti-agregantes que atua perturbando as pontes salinas entre os resíduos de histidina e asparagina nos resíduos da conformação beta promovendo a formação ao acaso do peptídeo A β o que facilita a sua eliminação. Em contraste com muitos compostos anti-agregantes, a melatonina pode efetivamente atravessar a barreira hematoencefálica (Pappolla et al., 1998).

Por outro lado, um maior número de compostos polifenóis foram descritos como agentes anti-agregantes. A curcumina (**42**) é um ingrediente conhecido da culinária tradicional indiana obtida da planta *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae). Esse polifenol é capaz de inibir eficazmente a formação dos oligômeros de A β , se liga nas placas já existentes bem como reduz as placas amiloides *in vivo* (Yang et al., 2005) possuindo melhor permeabilidade do que compostos similares porém sintéticos como o Vermelho Congo. A curcumina também possui inúmeras outras atividades benéficas incluindo propriedades anti-inflamatória e antioxidante as quais podem contribuir para o efeito neuroprotetor desta substância (Ray and Lahiri, 2009). Devido a inúmeras qualidades atrativas, incluindo a permeabilidade pela barreira hemato-encefálica e mínima toxicidade, Logvida, uma formulação a base de curcumina está em um estudo clínico de fase II para a doença de Alzheimer (NCT01001637) (Williams et al., 2011). A epigallocatequina galato (EGCG) (**43**), o polifenol popular do chá verde, é um promissor composto neuroprotetor de acordo com inúmeros estudos em células e animais. Estes efeitos se devem aos seus já conhecidos efeitos antioxidantes, regulação dos genes que regulam a morte programada das células e modulação de funções mitocondriais. Em particular, EGCG reduz os níveis tóxicos do A β através da ativação da via não-amiloidogênica pela indução da α -secretase e previnem a agregação de A β em sua forma oligomérica tóxica pela ligação direta nas proteínas não agregadas. Esses múltiplos efeitos benéficos da ECGC para a patologia da DA levaram aos estudos clínicos dessa substância para avaliar a sua eficácia em estados iniciais da doença (Park, 2010).



42



43

6.5. Efeitos simultâneos em múltiplos alvos relacionados com a DA

A maioria dos compostos examinados até o presente momento que apresentaram relevância direta para a DA são primariamente derivados de plantas com comparativamente poucas moléculas derivadas de fontes marinhas e biológicas. Também, até o momento, o maior sucesso da farmacoterapia originou-se de programas para a descoberta de novos inibidores da AChE a partir das plantas o que forneceu quatro das atuais drogas disponíveis para o tratamento da DA. Entretanto, é amplamente aceito que estes inibidores da AChE possuem somente efeitos para o tratamentos a curto prazo do sintomas relacionados com a DA e que uma nova classe de fármacos se faz necessária (Williams et al., 2011).

Uma vez que a DA é uma doença neurodegenerativas complexa, resultante de múltiplas anormalidades celulares e não somente de um defeito em um único gene ou alvo (Querfurth and LaFerla, 2010), a identificação em uma única entidade química capaz de afetar simultaneamente múltiplos alvos envolvidos na cascata neurodegenerativa que leva a DA pode alcançar uma melhor eficácia terapêutica (Bolognesi et al., 2011b). Essa abordagem direcionou muitos pesquisadores para um novo paradigma na química medicinal, a estratégia de design de "ligantes diretos multi-alvos" (MTDL). Seguindo esta nova abordagem muitos novos ligantes capazes de interagir simultaneamente em múltiplos alvos biológicos relacionados com a DA foram desenvolvidos. Alguns destes fármacos se encontram e ensaios

pré-clínicos como o memoquim (**9**), um poliamina com um grupamento quinona capaz de inibir a agregação espontânea e induzida pela AChE do A β bem como a sua formação pela inibição da enzima BACE1 além de também atuar como antioxidante (Bolognesi et al., 2007a; Cavalli et al., 2007).

Indo de encontro a nova tendência da descoberta de novos fármacos para o tratamento da DA, a incrível capacidade inibitória da uleína (nM) sobre a BACE1, sua habilidade de inibir fracamente a agregação espontânea do peptídeo A β juntamente com a capacidade de inibir ambas as enzimas responsáveis pela regulação dos níveis de ACh, demonstram um novo e interessante perfil de um composto natural capaz de modificar a evolução da DA. Este perfil ainda não foi apresentado pelos produtos atualmente disponíveis no mercado nem por muitos outros compostos naturais mais ativos aqui descritos porém capazes de interagir somente em um único alvo.

6.6. Ensaios com a enzima hrBACE1 imobilizada

Devido ao importante papel desempenhado pela enzima hrBACE1 como enzima limitante na produção do peptídeo beta-amiloide (A β), o principal constituinte das placas amiloides encontradas no cérebro de pacientes com a DA, o desenvolvimento de novos métodos mais rápidos para a detecção de novos inibidores possui relevância crítica no processo de desenvolvimento de novos fármacos.

Os métodos mais utilizados para medium- ou high-throughput screening de inibidores de hrBACE1 envolvem ensaios baseados nos princípios de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). Ensaios FRET são geralmente reprodutíveis e sensíveis, porém possuem algumas desvantagens como longo tempo para análise (mais de 1 h), elevado consumo de enzima, variabilidade devido ao diferentes lotes e fontes de enzima, exigem um manuseio elevado de soluções o que geram erros experimentais e são

destrutíveis. Além disso muitos compostos sintéticos e naturais apresentam limitações de solubilidade nas condições do ensaio FRET gerando falso positivos ou falso negativos (McGovern et al., 2003). Muitos efeitos inespecíficos de algumas classes de compostos testados como inibidores se devem as suas capacidades de formar agregados capazes de incorporar e absorver enzimas. Portanto, inibidores “promíscuos” se ligam a enzimas de maneira não-específica sem uma interação direta (Ryan et al., 2003).

Enzimas imobilizadas podem ser empacotadas em colunas e utilizadas em sistemas de fluxo formando reatores de enzimas imobilizadas (IMER). Esta técnica não necessita de enzimas extremamente purificadas ou uma grande quantidade de enzimas, mas podem aumentar a estabilidade da enzima contra o aquecimento, solventes orgânicos e pH sem alterar significativamente a atividade catalítica. Portanto, uma enzima imobilizada se torna um catalizador confinado ou localizado em um suporte adequado e pode ser utilizado repetidamente até quando se mantenha ativo, e assim contribui para diminuir os custos, tempo de análise e torna o ensaio economicamente favorável para ser utilizado de modo contínuo. Todos estes fatores combinados melhoram a precisão e a reprodutibilidade deste método (Girelli and Mattei, 2005).

O acoplamento de um IMER a um sistema CLAE permite a combinação da seletividade, rapidez deste método não destrutível com a especificidade e sensibilidade de uma reação enzimática. Dentro deste contexto, a sensibilidade do sistema de detecção é consideravelmente aumentada e a determinação de traços de componentes em matrizes complexas se torna possível (Girelli and Mattei, 2005).

Em um trabalho realizado anteriormente, um método cromatográfico com hrBACE1-IMER foi desenvolvido para a detecção de inibidores da BACE1 utilizando o peptídeo fluorogênico M-2420 (**33**) como substrato (Mancini and Andrisano, 2010; Mancini et al., 2007). Esse método demonstrou ser rápido, reprodutível, executável e sensível, porém apresentou algumas limitações na aplicação com produtos naturais ou sintéticos que

apresentam auto-fluorescência devido a presença de anéis aromáticos conjugados que podem interferir na detecção (320/420 nm) da atividade da enzima utilizando este substrato (Kornacker et al., 2005).

Neste trabalho, utilizando o mesmo procedimento de imobilização foi desenvolvido um método cromatográfico alternativo com o objetivo final de permitir a detecção on-line da atividade inibitória da BACE1 utilizando o peptídeo fluorogênico Substrato IV (**32**) como substrato dotado de pares de comprimento de ondas mais seletivos de maior absorção e emissão (350/460) permitindo a avaliação de composto auto-fluorescentes.

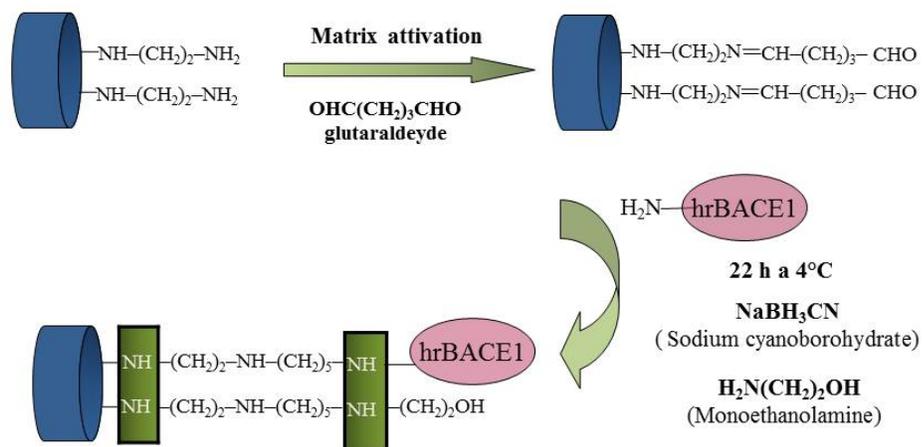
Os requisitos para os screenings high throughput (HTS) são diferentes daqueles relacionados para a detecção de inibidores nM. Para a finalidade HTS, a redução de artefatos espectroscópicos é importante, entretanto a quantidade de enzima no ensaio não possui importância crítica uma vez que altas concentrações de compostos testes são geralmente empregadas (Mancini et al., 2011).

O hrBACE1-IMER foi preparado imobilizando a enzima beta-secretase recombinante em um disco monolito de EDA-CIM[®] que se baseia em um novo material polimérico macroporoso disponível sob o nome registrado de meio convectivo de interação (CIM[®]). Este suporte foi escolhido por serem promissores para aplicações analíticas por proporcionarem tempo de análise reduzido e elevada eficiência enzimática (Strancar et al., 1996). Discos CIM[®] são caracterizados por possuírem pequenas dimensões (12 mm de diâmetro 3 mm de largura) e consistem em uma fase estacionária monolítica alojada em um invólucro plástico apropriado. A introdução de suportes monolíticos foi possível alcançar a total ausência de limitações de difusão superando as desvantagens de alargamento de bandas devido a interações não-específicas a enzima e a influência do fluxo na eficiência de conversão do substrato (Girelli and Mattei, 2005).

6.6.1. Imobilização da hrBACE1

A técnica de imobilização *in situ* foi utilizada para a imobilização da enzima no suporte escolhido. Nesta técnica a enzima foi diretamente imobilizada no disco monolito. A técnica *in situ* é considerada a melhor forma de obter resultados satisfatórios em termos de quantidade de enzimas imobilizadas e retenção da atividade enzimática (Massolini et al., 2001).

Seguindo o procedimento de imobilização já descrito e validado (Bartolini et al., 2004; Mancini and Andrisano, 2010; Mancini et al., 2007) a hrBACE1 foi imobilizada com sucesso. O esquema da imobilização da hrBACE1 está descrito no esquema 2. As condições empregadas foram adequadas para a condensação de um grande número de grupamentos amina com os grupos aldeídicos do glutaraldeído, minimizando assim interações não específicas catiônicas entre os produtos iônicos das reações enzimáticas com as funções amina protonadas residuais presentes no disco monolito. Após a ativação da matrix, hrBACE1 foi ligada ao grupo aldeídico livre pela formação de uma base de Schiff entre o grupo aldeídico e o grupo ϵ -amino do resíduo de lisina. Uma subsequente redução das ligações duplas resultantes foi obtida pela solução de cianoborohidreto de sódio e as bases de Schiff formadas durante o processo de imobilização foram reduzidas. Finalmente, os grupos aldeídicos que não reagiram foram desativados pela solução de monoetanolamina (Bartolini et al., 2004).



Esquema 2. Esquema exemplificando o processo de imobilização da hrBACE1 no disco EDA-CIM[®].

As técnicas geralmente utilizadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas principalmente em processos químicos e físicos. Métodos de imobilização química incluem a ligação da enzima a matriz por ligações covalentes e ligações cruzadas entre a enzima e a matriz. A formação da base covalente de Schiff é um modo de ligação covalente de imobilização química que oferece uma grande vantagem prevenindo fenômenos de desorção na presença do substrato e soluções de elevada força iônica. Além disso, reduzem as taxas de desativação espontânea da enzima como na autodigestão de proteases. Esses benefícios contribuem para a obtenção de um IMER com maior tempo de vida, porém são contrabalanceados por uma maior facilidade de alteração da estrutura terciária da enzima com subsequente diminuição da atividade catalítica (Girelli and Mattei, 2005).

6.5.2. Rendimento da imobilização

O processo de imobilização foi realizado para permitir a ligação do maior número de unidades de enzima ao disco EDA-CIM[®] capaz de converter o substrato em uma quantidade suficiente de produto para ser detectado. Medindo a intensidade do sinal de fluorescência da solução de enzima antes e após o processo de imobilização permitiu a determinação do rendimento do procedimento de imobilização.

Nas condições descritas, das 1037 unidades de hrBACE1 incubadas com o disco EDA-CIM[®] aproximadamente 51 % das unidades foram imobilizadas (529 unidades).

6.5.3. Determinação da atividade do hrBACE1-IMER

A verificação da atividade da hrBACE1 imobilizadas no EDA-CIM[®] foi realizada utilizando o M-2420 como substrato. Na figura 13 é possível observar a correlação linear entre a quantidade de produto (MCA) obtida a partir da hidrólise de crescentes concentrações de substrato (M-2420) pelo EDA-CIM[®].

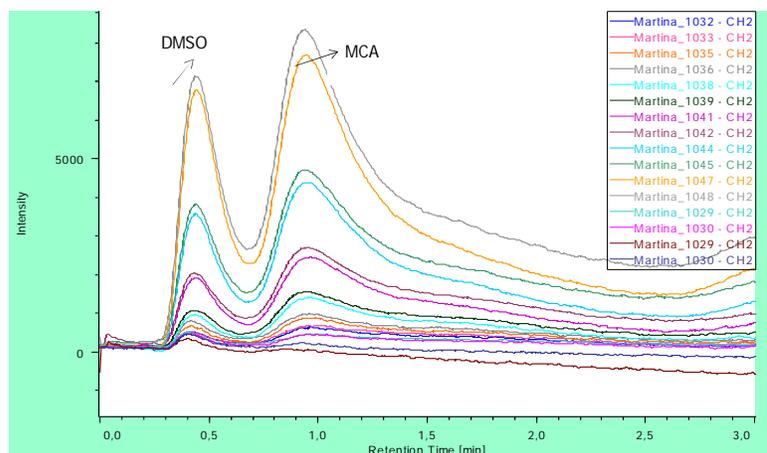


Figura 13. Cromatograma do produto de hidrólise (MCA) obtido pela injeção (10 μ l) de concentrações crescentes do substrato M-2420 (0,03 to 2,35 μ M) no hrBACE1-IMER. FM: NaH₂PO₄ 50 mM CHAPS 0.1% p/v, pH 5,5, fluxo: 1.0 ml/min; 320/420 gain x100.

6.5.4 Determinação do número de enzimas imobilizadas ativamente hrBACE1-IMER

Para caracterizar o hrBACE1-IMER em termos do número de enzimas ativas e para determinar a quantidade de produto ($\text{pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$) formada pela hidrólise enzimática, uma curva padrão de MCA foi obtida pela injeção de $10\ \mu\text{l}$ de soluções de concentrações crescentes de MCA (0,16 a 2,46 nM, concentração normalizada) no disco EDA-CIM[®] sem a enzima imobilizada. As áreas dos picos obtidas foram relacionadas com a concentração respectiva de MCA (nM) (Figura 14) e a curva padrão foi obtida.

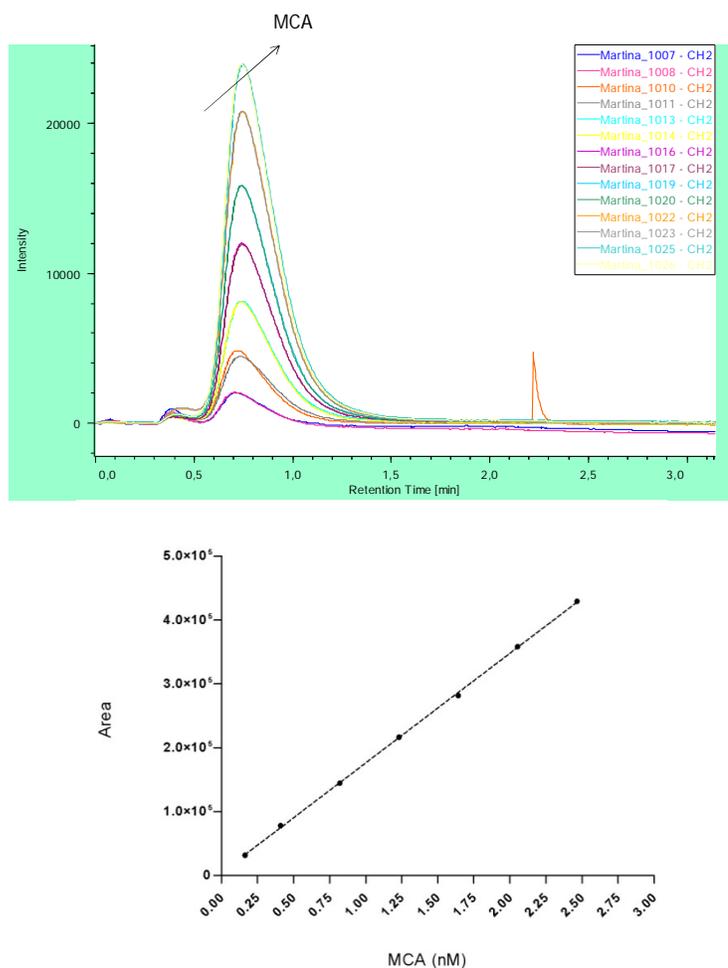


Figura 14. Cromatograma do produto de hidrólise MCA obtido pela injeção ($10\ \mu\text{l}$) de soluções de concentrações crescentes de MCA (0,16 to 2,46 nM concentração normalizada) no EDA-CIM[®] disk sem a enzima. FM: NaH_2PO_4 50 mM CHAPS 0.1% w/v, pH 5.5, fluxo 1.0 ml/min; 320/420 gain x100.

A curva resultante foi linear, $y = 171700 (\pm 922.2) x + 4445$, $r^2 = 0.9997$. O resultado é a média dos coeficientes de correlação, coeficientes angulares e interceptação da linha para as curvas de calibração obtidas em dias diferentes.

O segundo passo foi a injeção de soluções crescentes de M-2420 (0,03 a 2,35 μM concentrações normalizadas) no hrBACE1-IMER nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para a curva de calibração (Figura 15). As áreas dos picos obtidas a partir da hidrólise do substrato foram integradas e convertidas nas respectivas concentrações (nM) de MCA e posteriormente em utilizando a equação da curva de calibração. A velocidade da reação foi obtida em termos de concentração de produto obtida por minuto ($\text{pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$) e a quantidade de enzimas imobilizadas ativamente foi obtido.

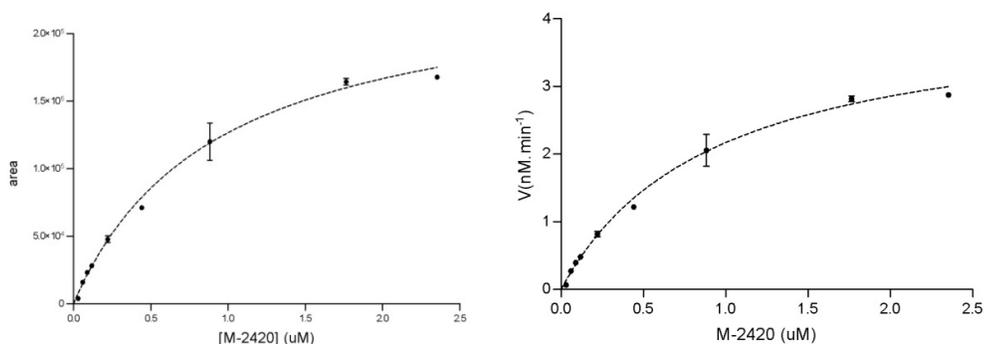


Figura 15. Michaelis-Menten obtido pela análise hrBACE1-IMER acoplada ao sistema CLAE com detecção por fluorescência (320/420) (a) produto (MCA) de hidrólise enzimática obtido a partir da curva de calibração vs área normalizada de cada concentração injetada de M-2420, (b) velocidade da reação (V_{max}) expressa em $\text{nM}\cdot\text{min}^{-1}$ de M2420 hidrolisado pela hrBACE1.

Para comparar os dados obtidos com o hrBACE1-IMER com aqueles obtidos com os ensaios em solução utilizando o método FRET e as constantes de V_{max} e K_M para ambos os métodos foram determinadas (Tabela 3).

Tabela 3

Constantes de Michaelis-Menten para a clivagem do substrato M-2420 pela enzima hrBACE1 em solução e imobilizada. Valores são a média de dois experimentos independentes, cada um realizado em duplicate \pm SEM.

M2420	K_{max}^{app}	V_{max}^{app}
hrBACE1 em solution	$1.043 \pm 0.97 \text{ uM}$	$2.88 \pm 0.44 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}$
hrBACE1-IMER	$1.47 \pm 0.27 \text{ uM}$	$0.05 \pm 0.01 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}$

Os resultados para os parâmetros cinéticos para a enzima em solução estão de acordo com caracterizações já realizadas previamente para este substrato (Ermolieff et al., 2000; Mancini and Andrisano, 2010).

Uma vez que uma unidade de enzima beta-secretase recombinante humana (U) é capaz de hidrolisar 1,0 pmol de M2420 por min em pH 4.5 a 37°C, o número de enzimas imobilizadas ativamente nas condições do ensaio foram $0,05 \pm 0,01U$. Esse valor está de acordo com outros trabalhos já realizados e disponíveis na literatura (Bartolini et al., 2004; Mancini and Andrisano, 2010; Mancini et al., 2007).

Apesar do baixo rendimento do número de unidades de enzimas imobilizadas ativamente, a eficiência catalítica do IMER, determinada pela razão de K_M/V_{max} , foi melhor do que aquela para a enzima livre, indicando uma conversão enzimática mais rápida pelo IMER.

6.5.5. Caracterização do hrBACE-IMER pelo Substrate IV

O substrato IV contém como par de fluoróforo os grupos ácido 5-[(1-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfônico (1,5-EDANS) doador e ácido 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzóico (DABCYL) receptor e possui a sequência Suíça mutada da proteína precursora amiloide APP reconhecida pela BACE1

As condições da fase móvel foram otimizadas em termos de pH ótimo para a atividade enzimática, força iônica para permitir a solubilidade do substrato e inibidores e velocidade de fluxo para mais rapidez de eluição do produto de catálise enzimática (dados não apresentados).

A fase móvel após o processo de otimização que forneceu as melhores condições para a obtenção de picos simétricos de 1,5-EDANS consistiu em uma solução contendo tampão fosfato 50 mM, pH 5,0 e fluxo 1,0 ml/min. A clivagem realizada pela BACE1 ocorre em compartimentos ácidos como o complexo de Golgi e o sistema endossomal, embora

grande parte seja encontrada no retículo endoplasmático e na superfície celular. A enzima apresenta maior atividade em pH entre 4,0 – 4,5 e, portanto, um pH ácido é geralmente utilizados para ensaios *in vitro* (Mancini et al., 2011).

A enzima imobilizada adquire reconhecidamente novas propriedades cinéticas que podem modificar as constantes de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max}) e causam uma mudança nos perfis de pH e temperatura de atividade (Girelli and Mattei, 2005).

Utilizando as condições cromatográficas otimizadas para a análise, uma quantidade significativa de produto fluorescente foi obtida após a clivagem do substrato pelo hrBACE1-IMER após um curto tempo de contato (CT) (0,34 min sob fluxo 1,0 ml.min⁻¹). Cabe ressaltar que nos métodos tradicionais em solução, para determinar a mesma atividade enzimática são necessários mais de 60 min de incubação (enzima com inibidor) e outros 30 min para a detecção final da atividade.

Para caracterizar os picos obtidos pela digestão enzimática on-line, injeções múltiplas de substrato IV (3 µM, concentração normalizada) foram realizadas utilizando a fase móvel otimizada e detecção em 490 nm (excitação em 355 nm). O pico obtido após a hidrólise enzimática do substrato mostrou ser consistente com aquele do 1,5-EDANS em termos de tempo de retenção. A figura 16 mostra os cromatogramas resultantes da injeção do substrato IV e do seu produto de hidrólise no hrBACE1-IMER. O substrato IV injetado em duas concentrações apresenta os picos referentes ao produto de hidrólise (1,5-EDANS) sobrepostos com aquele do produto de hidrólise de referência injetado. O pico que elui em 0,8 min corresponde ao produto de hidrólise 1,5-EDANS decorrente da hidrólise do substrato IV pela enzima imobilizada. Quando o substrato IV foi injetado ao disco EDA-CIM[®] que não continha a enzima imobilizada, não apresentou nenhum sinal de fluorescência significativo nos comprimentos de onda selecionados a não ser que o substrato esteja degradado. Esse procedimento foi realizado para detectar a estabilidade do substrato IV.

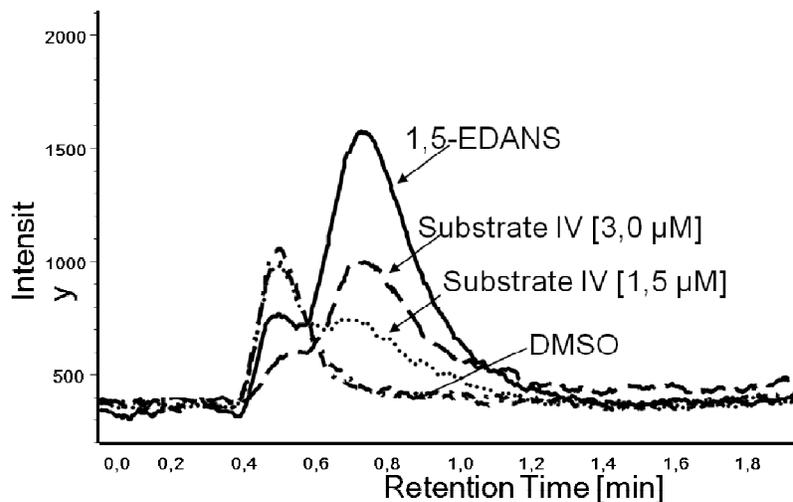


Figura 16. Os cromatogramas sobrepostos foram obtidos com a injeção de fragmento fluorogênico 1,5-EDANS, substrato IV em duas concentrações e DMSO ao hrBACE1-IMER. A fase móvel consistiu de tampão fosfato 50 mM pH 5,0, fluxo 1 ml/min e volume de injeção 10 μ l. A área dos picos obtidas após a clivagem do substrato pela enzima imobilizada são proporcionais a concentração e o tempo de retenção é comparável com aquele referente ao fragmento fluorogênico 1,5-EDANS, seu produto de hidrólise.

Para determinar a velocidade de hidrólise do Substrato IV ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$), uma curva padrão com o seu fragmento fluorescente foi obtida. Concentrações diferentes de 1,5-EDANS (0,12-29,0 nM, concentrações normalizadas) foram injetadas no sistema CLAE EDA-CIM[®] com detecção em 485 nm (excitação: 350 nm) (Figura 17).

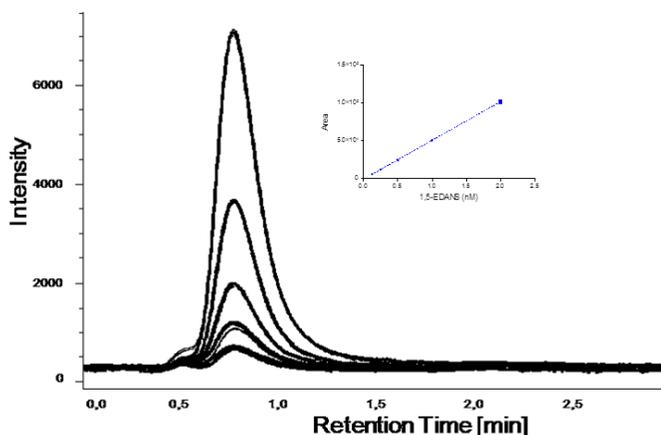


Figura 17. Cromatogramas sobrepostos relativos à injeção do produto de hidrólise do substrato IV, 1,5-EDANS (0,12-29,0 nM) no disco EDA-CIM[®]. Fase móvel tampão fosfato 50 mM pH 5,0, fluxo 1 ml/min e volume de injeção 10 μ l. As áreas dos picos foram integradas e plotadas versus a concentração normalizada de 1,5-EDANS para obter a curva de calibração.

Uma regressão linear foi obtida plotando os valores das áreas *versus* a concentração normalizada de 1,5-EDANS ($y=51250x-979.5$, $r^2=0.992$). Depois, injeções de concentrações crescentes de Substrato IV (0.4 a 7.3 μM , concentrações normalizadas) foram injetadas sob as mesmas condições cromatográficas e o gráfico relacionando a área do produto obtido pela concentração de substrato (Figura 18).

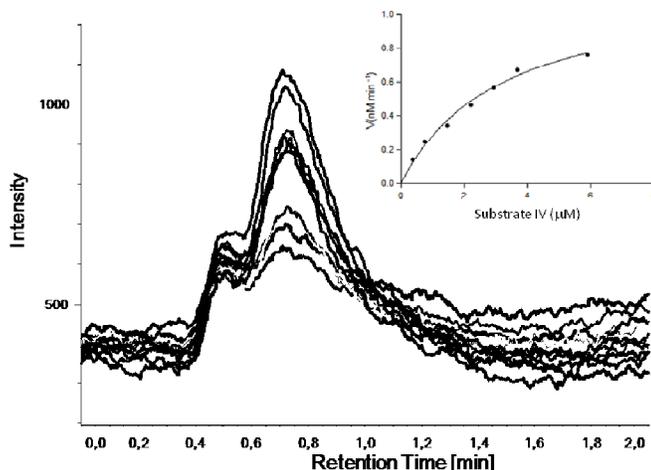


Figura 18. Os cromatogramas sobrepostos relativos às injeções de concentrações crescentes de Substrato IV (0,4 a 7,3 μM concentrações normalizadas) no hrBACE1-IMER. Fase móvel: tampão fosfato 50 mM, pH 5.0, fluxo 1 ml/min e volume de injeção 10 μl . Os valores das áreas foram convertidos em concentração (nM) a partir da equação da curva de calibração e posteriormente relacionado ao tempo de contato (0,34 min) O gráfico de Michaelis-Menten foi obtido pela relação entre a velocidade da reação e as concentrações normalizadas de substrato IV.

O gráfico de Michaelis-Menten foi obtido plotando as velocidades das reações ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$) *versus* a concentração de cada substrato e os parâmetros de K_M e V_{max} foram derivados e estão reportados na tabela 4 e os valores comparados com aqueles obtidos com aqueles obtidos com a enzima em solução e com os valores utilizando o substrato M-2420 com a enzima imobilizada.

Tabela 4

Parâmetros cinéticos para o substrato IV com a enzima BACE1 em solução e no hrBACE1-IMER. Os valores são a média de dois experimentos independentes \pm SEM, cada um realizado em duplicata.

Substrato IV	K_M	V_{max}
hrBACE1 em solução	$2.03 \pm 0.12 \mu\text{M}$	$0.118 \pm 0.01 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}$
hrBACE1-IMER	$8.28 \pm 0.53 \mu\text{M}$	$0.01 \pm 0.00 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}$

A presença de uma cadeia com doze aminoácidos entre os grupos doador e aceptor da fluorescência pode ser provavelmente a razão para a menor taxa de conversão do substrato IV quando comparado ao M-2420. Para muitas proteases a taxa de conversão depende diretamente do tamanho e da natureza desta cadeia peptídica. Além disso, o substrato IV apresentou menor sensibilidade do que o M-2420 devido a baixa intensidade de fluorescência de seu grupo DANSYL. Na tabela 5, os parâmetros cinéticos obtidos com o hrBACE1-IMER para ambos os substratos pode ser observado. A mesma taxa baixa de conversão (V_{max}) observada para o M2420 foi obtida para o Substrato IV. Porém, foi obtido um elevado valor de K_M com a enzima imobilizada maior do que aquele com a enzima livre. Isto pode ser devido a mudanças na solução nas imediações da enzima imobilizada, efeitos de difusão molecular entre o ambiente local ou impedimento estérico do maior substrato IV.

Entretanto, o pico obtido a partir da clivagem do substrato IV no sistema CLAE hrBACE1-IMER foi adequado para permitir a determinação das constantes catalíticas com acurácia e reprodutibilidade. Portanto, embora as constantes cinéticas não tão favoráveis, o substrato IV é adequado para a realização de ensaios de inibição enzimáticos principalmente com compostos auto-fluorescentes devido à seletividade intrínseca em comprimentos de onde de absorção e emissão maiores.

Tabela 5

Parâmetros cinéticos da clivagem pelo hrBACE1-IMER do substrato M-2420 e Substrato IV. Os valores são a media de dois experimentos independentes (\pm SEM), cada um realizado em duplicata.

hrBACE1-IMER	K_M	V_{max}
M-2420	$1.47 \pm 0.27 \mu\text{M}$	$0.05 \pm 0.01 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}$
Substrato IV	$8.28 \pm 0.53 \mu\text{M}$	$0.01 \pm 0.00 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}$

6.5.6. Ensaios de inibição no hrBACE1-IMER

Com o objetivo de comparar os dados de estudos on-line com dados presentes na literatura, uma correlação entre ensaios de inibição on e off-line foi realizada (Bartolini et al., 2005; Bartolini et al., 2009). O potencial inibitório de inibidores conhecidos da BACE1 foi determinado para validar o sistema CLAE-hrBACE1-IMER aplicado ao substrato IV. Os valores de IC_{50} (**7**) um conhecido inibidor da BACE1 (Stachel et al., 2004) foi calculado pela comparação da área do pico obtida na presença e na ausência do inibidor. Uma redução da área do pico obtida para ambos os substratos foi observada com concentrações crescentes de inibidor. O mesmo experimento foi realizado também com a enzima em solução e os valores de IC_{50} obtidos comparados (Tabela 6). O percentual de inibição foi relacionado com o logaritmo das concentrações normalizadas de inibidor e os valores de IC_{50} obtidos pela interpolação dos resultados a partir das curvas de calibração (Figura 19). Os valores de IC_{50} encontrados para ambos os substratos estão de acordo com os métodos utilizados e com os dados descritos em literatura (Mancini et al., 2007; Stachel et al., 2004).

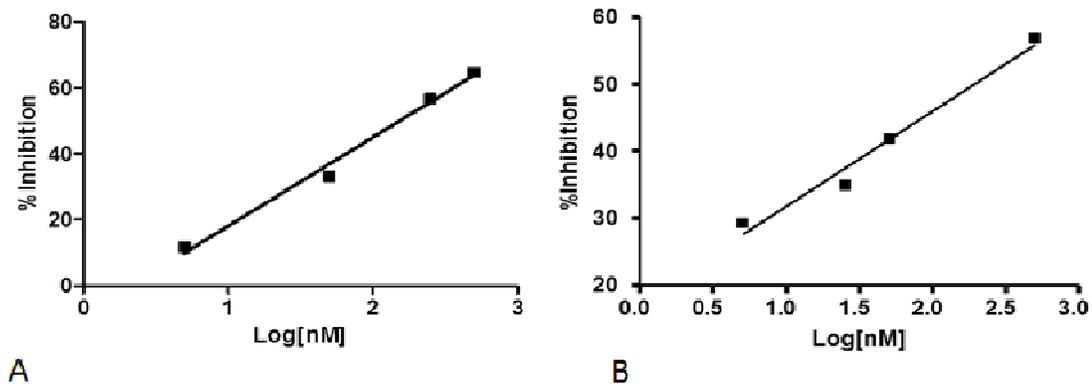


Figura 19. Os parâmetros de regressão linear foram obtidos pela comparação da área do produto de hidrólise de M-2420 (A) e do substrato IV (B) na presença e na ausência de concentrações crescentes de inibidor. Os valores obtidos foram plotados contra o logaritmo da concentração normalizadas do inibidor. Os valores de IC_{50} para o inibidor IV foram calculados e encontram-se consistentes para ambos os substratos.

Tabela 6

Valores de IC_{50} para o inibidor IV obtidos a partir do ensaio FRET com a enzima BACE1 em solução e com o hrBACE1-IMER utilizando ambos os substratos (M-2420 e substrato IV). Os valores são a média de dois experimentos independentes (\pm SEM), cada um realizado em duplicata.

Inibidor IV	IC_{50} (μ M), BACE1 em solução	IC_{50} (μ M), hrBACE1-IMER
substrate IV	0.02 \pm 0.01	0.192 \pm 0.02
substrato M2420	0.02 \pm 0.00 ^(*)	0.154 \pm 0.00

^(*) da referência (Mancini and Andrisano, 2010)

Finalmente, para verificar a aplicabilidade do biorreator para a determinação do potencial inibitório de compostos que apresentam auto-fluorescência capaz de interferir com a visualização da atividade enzimática utilizando o substrato M-2420, o valor de IC_{50} do composto uleína foi determinado. Para tanto, concentrações crescentes de uleína foram injetadas concomitantemente com uma concentração fixa de substrato em um procedimento similar aquele utilizado para o inibidor IV.

O valor de IC_{50} encontrado 0.57 \pm 0.05 nM utilizando o hrBACE1-IMER está consistente com aquele encontrado no ensaio com a enzima em solução. Embora o valor obtido utilizando o biorreator tenha sido três vezes menor do que aquele obtido com a enzima em solução, ainda foi possível determinar a atividade de um composto com potencial de inibição nM. Portanto, o método desenvolvido permitiu não somente a caracterização da inibição de compostos auto-fluorescentes, mas também permitiu a quantificação nM da atividade inibitória destes compostos. No passado, utilizando os métodos previamente descritos (Mancini and Andrisano, 2010; Mancini et al., 2007) não era possível a identificação da atividade destes compostos uma vez que o substrato de escolha era o M-2420 sendo necessária a combinação deste método com ensaios de inibição em solução com um substrato muito específico e de elevado custo (peptídeo Panvera[®]) o qual possui maiores propriedades de excitação e emissão em ensaios FRET (λ_{exc} = 544 nm, λ_{em} = 590 nm) o que tornava a caracterização destes tipos de compostos mais difícil, demorada e custosa.

Os resultados deste estudo foram publicados em De Simone et al. 2014.

7. Conclusão e trabalhos futuros

O potencial multi-alvo do alcaloide indólico uleína contra alvos validade relacionados à doença de Alzheimer destacando-se as enzimas acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e beta-secretase bem como o peptídeo beta amiloide foi demonstrado e pode indicar que compostos com estruturas químicas relacionadas podem servir como protótipos interessantes para o desenvolvimento de novas drogas. Além disso, as atividades biológicas aqui apresentadas, especialmente relacionadas à atividade inibitória da enzima beta-secretase, se destacam quando comparadas com as atividades de outros produtos naturais já descritos.

Um método cromatográfico rápido, reprodutível e executável com detecção por fluorescência para o ensaio de inibição da enzima beta-secretase recombinante humana utilizando um substrato fluorogênico conhecido como substrato IV foi desenvolvido e aplicado para a avaliação de atividade enzima hrBACE1 imobilizada e sua inibição por um composto natural o qual apresentava propriedades auto-fluorescentes. O método provou ser sensível e permitiu a detecção seletiva do produto de reação enzimática e estudos de inibição foram realizados mesmo com poucas unidades de enzimas ativas disponíveis. A imobilização da enzima no disco de monolito permitiu um aumento na estabilidade da enzima e a execução de ensaios reprodutíveis.

Este método pode ser associado com técnicas analíticas modernas como HR-MAS RMN, CLAE-RMN, DESI-EM/EM, CLAE EM/EM para a identificação e isolamento de novos compostos bioativos de material vegetal *in natura*, de frações simples de extratos da biodiversidade brasileira e assim permitir a investigação simultânea do seu perfil em importantes alvos biológicos relacionados com a doença de Alzheimer.

8. Referências

- Abou-Rebyeh, H., Josic, D., Gottschall, K., Schubert-Rehberg, K., Korber, F., 1991. Purification of carbonic anhydrase isoenzymes by high-performance affinity chromatography and hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr.* 566, 351-359.
- Anand, R., Gill, K.D., Mahdi, A.A., 2014. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacol.* 76 Pt A, 27-50.
- Anekonda, T.S., Reddy, P.H., 2005. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? *Brain. Res. Rev.* 50, 361-376.
- Asai, M., Iwata, N., Yoshikawa, A., Aizaki, Y., Ishiura, S., Saido, T.C., Maruyama, K., 2007. Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease Abeta secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 498-502.
- Badja, M., Więckowska, A., Hebda, M., Guzior, N., Sottriffer, C.A., Malawska, B., 2013. Structure-Based Search for New Inhibitors of Cholinesterases. *International J. Molec. Sci.* 14, 5608-5632.
- Baggio, C.H., Otofujii, G.D., de Souza, W.M., Santos, C.A.D., Torres, L.M.B., Rieck, L., Marques, M.C.D., Mesia-Vela, S., 2005. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Med.* 71, 733-738.
- Bartolini, M., Andrisano, V., Wainer, I.W., 2003. Development and characterization of an immobilized enzyme reactor based on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies. *J. Chromatogr. A* 987, 331-340.
- Bartolini, M., Bertucci, C., Bolognesi, M.L., Cavalli, A., Melchiorre, C., Andrisano, V., 2007a. Insight into the kinetic of amyloid beta(1-42) peptide self-aggregation: Elucidation of inhibitors' mechanism of action. *Chembiochem* 8, 2152-2161.
- Bartolini, M., Cavrini, V., Andrisano, V., 2004. Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies. *J. Chromatogr. A* 1031, 27-34.
- Bartolini, M., Cavrini, V., Andrisano, V., 2005. Choosing the right chromatographic support in making a new acetylcholine sterase-micro-immobilised enzyme reactor for drug discovery. *J. Chromatogr. A* 1065, 135-144.
- Bartolini, M., Cavrini, V., Andrisano, V., 2007b. Characterization of reversible and pseudo-irreversible acetylcholine sterase inhibitors by means of an immobilized enzyme reactor. *J. Chromatogr. A* 1144, 102-110.
- Bartolini, M., Greig, N.H., Yu, Q.S., Andrisano, V., 2009. Immobilized butyrylcholinesterase in the characterization of new inhibitors that could ease Alzheimer's disease. *J. Chromatogr. A* 1216, 2730-2738.
- Bartolini, M., Naldi, M., Fiori, J., Valle, F., Biscarini, F., Nicolau, D.V., Andrisano, V., 2011. Kinetic characterization of amyloid-beta 1-42 aggregation with a multimethodological approach. *Anal. Biochem.* 414, 215-225.
- Bartus, R.T., 2000. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* 163, 495-529.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Pontecorvo, M.J., Flicker, C., 1985. The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. *Ann. NY Acad. Sci.* 444, 332-358.
- Bell, K.F., Ducatenzeiler, A., Ribeiro-da-Silva, A., Duff, K., Bennett, D.A., Cuellar, A.C., 2006. The amyloid pathology progresses in a neurotransmitter-specific manner. *Neurobiol. Aging* 27, 1644-1657.
- Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.C., Curran, E., Citron, M., Vassar, R., 2000. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* 275, 20647-20651.

- Bertram, L., Lill, C.M., Tanzi, R.E., 2010. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 68, 270-281.
- Bertucci, C., Bartolini, M., Gotti, R., Andrisano, V., 2003. Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 797, 111-129.
- BIA Separations d.o.o., 2014. CIM[®] Disk Monolithic Columns, mar 2014. Available in: <<http://www.biaseparations.com/products.asp?FolderId=248>>.
- Bolognesi, M.L., Banzi, R., Bartolini, M., Cavalli, A., Tarozzi, A., Andrisano, V., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., Bergamini, C., Fato, R., Lenaz, G., Hrelia, P., Cattaneo, A., Recanatini, M., Melchiorre, C., 2007a. Novel class of quinone-bearing polyamines as multi-target-directed ligands to combat Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 50, 4882-4897.
- Bolognesi, M.L., Bartolini, M., Tarozzi, A., Morroni, F., Lizzi, F., Milelli, A., Minarini, A., Rosini, M., Hrelia, P., Andrisano, V., Melchiorre, C., 2011a. Multitargeted drugs discovery: balancing anti-amyloid and anticholinesterase capacity in a single chemical entity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 2655-2658.
- Bolognesi, M.L., Cavalli, A., Melchiorre, C., 2009a. Memoquin: a multi-target-directed ligand as an innovative therapeutic opportunity for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 6, 152-162.
- Bolognesi, M.L., Cavalli, A., Valgimigli, L., Bartolini, M., Rosini, M., Andrisano, V., Recanatini, M., Melchiorre, C., 2007b. Multi-target-directed drug design strategy: from a dual binding site acetylcholinesterase inhibitor to a trifunctional compound against Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 50, 6446-6449.
- Bolognesi, M.L., Matera, R., Minarini, A., Rosini, M., Melchiorre, C., 2009b. Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 303-308.
- Bolognesi, M.L., Rosini, M., Andrisano, V., Bartolini, M., Minarini, A., Tumiatti, V., Melchiorre, C., 2009c. MTDL design strategy in the context of Alzheimer's disease: from lipocrine to memoquin and beyond. *Curr Pharm Des* 15, 601-613.
- Bolognesi, M.L., Simoni, E., Rosini, M., Minarini, A., Tumiatti, V., Melchiorre, C., 2011b. Multitarget-directed ligands: innovative chemical probes and therapeutic tools against Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 2797-2806.
- Bourne, Y., Grassi, J., Bougis, P.E., Marchot, P.J., 1999. *Biol. Chem.*
- Brandão, M.G.L., Consenza, G.P., Moreira, R.A., Monte-Flor, R.L.M., 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 408-420.
- Brunhofer, G., Fallarero, A., Karlsson, D., Batista-Gonzalez, A., Shinde, P., Gopi Mohan, C., Vuorela, P., 2012. Exploration of natural compounds as sources of new bifunctional scaffolds targeting cholinesterases and beta amyloid aggregation: the case of chelerythrine. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 6669-6679.
- Byun, J.H., Kim, H., Kim, Y., Mook-Jung, I., Kim, D.J., Lee, W.K., Yoo, K.H., 2008. Aminostyrylbenzofuran derivatives as potent inhibitors for Abeta fibril formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5591-5593.
- Camps, P., Formosa, X., Galdeano, C., Munoz-Torrero, D., Ramirez, L., Gomez, E., Isambert, N., Lavilla, R., Badia, A., Clos, M.V., Bartolini, M., Mancini, F., Andrisano, V., Arce, M.P., Rodriguez-Franco, M.I., Huertas, O., Dafni, T., Luque, F.J., 2009. Pyrano[3,2-c]quinoline-6-chlorotacrine hybrids as a novel family of acetylcholinesterase- and beta-amyloid-directed anti-Alzheimer compounds. *J. Med. Chem.* 52, 5365-5379.
- Cardoso, C.L., de Moraes, M.C., Cass, Q.B., 2009. Immobilization of the Enzymes on Chromatographic Supports: A Tool to Research of Inhibitor Compounds. *Quimica Nova* 32, 175-187.
- Cardoso, C.L., Lima, V.V., Zottis, A., Oliva, G., Andricopulo, A., Wainer, I.W., Moaddel, R., Cass, Q.B., 2006. Development and characterization of an immobilized enzyme

- reactor (IMER) based on human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies. *J. Chromatogr. A* 1120, 151-157.
- Cavalli, A., Bolognesi, M.L., Capsoni, S., Andrisano, V., Bartolini, M., Margotti, E., Cattaneo, A., Recanatini, M., Melchiorre, C., 2007. A small molecule targeting the multifactorial nature of Alzheimer's disease. *Angew. Chem. Int. Ed Engl* 46, 3689-3692.
- Cer, R.Z., Mudunuri, U., Stephens, R., Lebeda, F.J., 2009. IC₅₀-to-Ki: a web-based tool for converting IC₅₀ to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Res.* 37, W441-445.
- Chang, W.P., Downs, D., Huang, X.P., Da, H., Fung, K.M., Tang, J., 2007. Amyloid-beta reduction by memapsin 2 (beta-secretase) immunization. *Faseb J* 21, 3184-3196.
- Chang, W.P., Koelsch, G., Wong, S., Downs, D., Da, H., Weerasena, V., Gordon, B., Devasamudram, T., Bilcer, G., Ghosh, A.K., Tang, J., 2004. In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *J. Neurochem.* 89, 1409-1416.
- Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlieden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., Hardy, J., et al., 1991. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353, 844-846.
- Cheung, J., Rudolph, M.J., Burshteyn, F., Cassidy, M.S., Gary, E.N., Love, J., Franklin, M.C., Height, J.J., 2012. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *J. Med. Chem.* 55, 10282-10286.
- Churcher, I., 2006. Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 6, 579-595.
- Copeland, R.A., 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, Second ed. Wiley-VCH, Inc., New York.
- Cummings, J.L., Back, C., 1998. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Am. J. Ger. Psych.* 6, S64-S78.
- Dai, J., Jimenez, J.I., Kelly, M., Williams, P.G., 2010. Dictazoles: potential vinyl cyclobutane biosynthetic precursors to the dictazolines. *J. Org. Chem.* 75, 2399-2402.
- Darvesh, S., Hopkins, D.A., Geula, C., 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev. Neurosci.* 4, 131-138.
- De Ferrari, G.V., Canales, M.A., Shin, I., Weiner, L.M., Silman, I., Inestrosa, N.C., 2001. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* 40, 10447-10457.
- de Moraes, M.C., Ducati, R.G., Donato, A.J., Basso, L.A., Santos, D.S., Cardoso, C.L., Cass, Q.B., 2012. Capillary bioreactors based on human purine nucleoside phosphorylase: a new approach for ligands identification and characterization. *J. Chromatogr. A* 1232, 110-115.
- De Simone, A., Seidl, C., Santos, C.A.M., Andrisano, V., 2014. Liquid chromatographic enzymatic studies with on-line Beta-secretase immobilized enzyme reactor and 4-(4-dimethylaminophenylazo) benzoic acid/5-[(2-aminoethyl) amino] naphthalene-1-sulfonic acid peptide as fluorogenic substrate. *J. Chromatogr. B* 953-954C, 108-114.
- Deutsch, J.A., 1971. The cholinergic synapse and the site of memory. *Science* 174, 788-794.
- Drtinova, L., Pohanka, M., 2013. Potentials of Huperzine A Use in Alzheimer Disease Treatment. *Chemicke Listy* 107, 12-15.
- Durairajan, S.S., Yuan, Q., Xie, L., Chan, W.S., Kum, W.F., Koo, I., Liu, C., Song, Y., Huang, J.D., Klein, W.L., Li, M., 2008. Salvianolic acid B inhibits Abeta fibril formation and disaggregates preformed fibrils and protects against Abeta-induced cytotoxicity. *Neurochem. Int.* 52, 741-750.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., Sussman, J.L., 2010. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* 187, 10-22.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Ermolieff, J., Loy, J.A., Koelsch, G., Tang, J., 2000. Proteolytic activation of recombinant pro-memapsin 2 (pro-beta-secretase) studied with new fluorogenic substrates. *Biochemistry* 39, 12450-12456.
- França, O.O., Brown, R.T., Santos, C.A.M., 2000. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. *Fitoterapia* 71, 208-210.
- Freitag, R., 1999. Utilization of enzyme-substrate interactions in analytical chemistry. *J. Chromatogr. B* 722, 279-301.
- Fujiwara, H., Iwasaki, K., Furukawa, K., Seki, T., He, M., Maruyama, M., Tomita, N., Kudo, Y., Higuchi, M., Saido, T.C., Maeda, S., Takashima, A., Hara, M., Ohizumi, Y., Arai, H., 2006. Uncaria rhynchophylla, a Chinese medicinal herb, has potent antiaggregation effects on Alzheimer's beta-amyloid proteins. *J. Neurosci. Res.* 84, 427-433.
- Gaskell, A.J., Joule, J.A., 1967. Structure of Uleine - Relative Stereochemistry. *Chem Ind - London*, 1089.
- Ghosh, A.K., Gemma, S., Tang, J., 2008. beta-secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5, 399-408.
- Girelli, A.M., Mattei, E., 2005. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *J. Chromatogr. B* 819, 3-16.
- Glenner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., et al., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Greenberg, D.A., Jin, K., 2006. Neurodegeneration and neurogenesis: focus on Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer. Res* 3, 25-28.
- Greig, N.H., Utsuki, T., Ingram, D.K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., Yu, Q.S., Mamczarz, J., Holloway, H.W., Giordano, T., Chen, D., Furukawa, K., Sambamurti, K., Brossi, A., Lahiri, D.K., 2005. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 17213-17218.
- Hage, D.S., 2002. High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding. *J. Chromatogr. B* 768, 3-30.
- Halldorsdottir, E.S., Jaroszewski, J.W., Olafsdottir, E.S., 2010. Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *alpestre*. *Phytochem.* 71, 149-157.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimers-Disease - the Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Hills, I.D., Vacca, J.P., 2007. Progress toward a practical BACE-1 inhibitor. *Curr Opin Drug. Discov. Devel.* 10, 383-391.
- Huang, D., Luthi, U., Kolb, P., Cecchini, M., Barberis, A., Caflisch, A., 2006. In silico discovery of beta-secretase inhibitors. *J Am Chem Soc* 128, 5436-5443.
- Huang, W.H., Sheng, R., Hu, Y.Z., 2009. Progress in the development of nonpeptidomimetic BACE 1 inhibitors for Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 16, 1806-1820.
- Hung, T.M., Dang, N.H., Kim, J.C., Jang, H.S., Ryoo, S.W., Lee, J.H., Choi, J.S., Bae, K., Min, B.S., 2010. Alkaloids from Roots of *Stephania rotunda* and Their Cholinesterase Inhibitory Activity. *Planta Med.* 76, 1762-1764.

- Hung, T.M., Na, M., Dat, N.T., Ngoc, T.M., Youn, U., Kim, H.J., Min, B.S., Lee, J., Bae, K., 2008. Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *J. Ethnopharmacol.* 119, 74-80.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., Smith, T.S., Simmons, D.L., Walsh, F.S., Dingwall, C., Christie, G., 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 419-427.
- Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Perez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., Garrido, J., 1996. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 16, 881-891.
- Ingkaninan, K., Phengpa, P., Yuenyongsawad, S., Khorana, N., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 695-700.
- Irie, Y., Keung, W.M., 2003. Rhizoma acori graminei and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid-beta peptide. *Brain Research* 963, 282-289.
- Iuvone, T., De Filippis, D., Esposito, G., D'Amico, A., Izzo, A.A., 2006. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 1143-1149.
- Jong, C.F., Derks, R.J.E., Bruyneel, B., Niessen, W., Irth, H., 2006. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *J. Chromatogr. A* 1112, 303-310.
- Josic, D., Buchacher, A., 2001. Application of monoliths as supports for affinity chromatography and fast enzymatic conversion. *J. Biochem. Biophys. Met.* 49, 153-174.
- Joule, J.A., Djerassi, C., 1964. *Alkaloid Studies*. 45. *Mass Spectrometry in Structural + Stereochemical Problems*. 42. *Some Aspects of Chemistry + Mass Spectrometry of Uleine*. *J. Chem. Soc.*, 2777-2790.
- Jung, H.A., Jin, S.E., Choi, R.J., Kim, D.H., Kim, Y.S., Ryu, J.H., Kim, D.W., Son, Y.K., Park, J.J., Choi, J.S., 2010. Anti-amnesic activity of neferine with antioxidant and anti-inflammatory capacities, as well as inhibition of ChEs and BACE1. *Life Sci.* 87, 420-430.
- Jung, H.A., Min, B.S., Yokozawa, T., Lee, J.H., Kim, Y.S., Choi, J.S., 2009. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1433-1438.
- Kaliskan, R., Wainer, I.W., 1997. *Chromatographic separations Based on Molecular Recognition*. Wiley, New York.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B., 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Kennedy, M.E., Wang, W., Song, L., Lee, J., Zhang, L., Wong, G., Wang, L., Parker, E., 2003. Measuring human beta-secretase (BACE1) activity using homogeneous time-resolved fluorescence. *Anal. Biochem.* 319, 49-55.
- Konrath, E.L., Ortega, M.G., de Loreto Bordignon, S., Apel, M.A., Henriques, A.T., Cabrera, J.L., 2013a. Alkaloid profiling and anticholinesterase activity of South American Lycopodiaceae species. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 28, 218-222.
- Konrath, E.L., Passos Cdos, S., Klein-Junior, L.C., Henriques, A.T., 2013b. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 1701-1725.
- Kornacker, M.G., Lai, Z.H., Witmer, M., Ma, J.H., Hendrick, J., Lee, V.G., Rixinger, D.J., Mapelli, C., Metzler, W., Copeland, R.A., 2005. An inhibitor binding pocket distinct from the catalytic active site on human beta-APP cleaving enzyme. *Biochemistry* 44, 11567-11573.

- Levine, H., 1993. Thioflavine-T Interaction with Synthetic Alzheimers-Disease Beta-Amyloid Peptides - Detection of Amyloid Aggregation in Solution. *Protein Sci.* 2, 404-410.
- Lopez, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C., 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.* 71, 2521-2529.
- Mancini, F., Andrisano, V., 2010. Development of a liquid chromatographic system with fluorescent detection for beta-secretase immobilized enzyme reactor on-line enzymatic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52, 355-361.
- Mancini, F., De Simone, A., Andrisano, V., 2011. Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1979-1996.
- Mancini, F., Naldi, M., Cavrini, V., Andrisano, V., 2007. Development and characterization of beta-secretase monolithic micro-immobilized enzyme reactor for on-line high-performance liquid chromatography studies. *J. Chromatogr. A* 1175, 217-226.
- Mancuso, C., Siciliano, R., Barone, E., Butterfield, D.A., Preziosi, P., 2011. Pharmacologist and Alzheimer's disease therapy: to boldly go where no scientist has gone before. *Exp. Opin. Investig. Drugs* 20, 1243-1261.
- Marco-Contelles, J., Garcia, A.G., León, R., 2013. Recent Advances in the Multitarget-Directed Ligands Approach for the treatment of Alzheimer's Disease. *Med. Res. Rev.* 33, 139-189.
- Massolini, G., Calleri, E., De Lorenzi, E., Pregnolato, M., Terreni, M., Felix, G., Gandini, C., 2001. Immobilized penicillin G acylase as reactor and chiral selector in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 921, 147-160.
- McConlogue, L., Buttini, M., Anderson, J.P., Brigham, E.F., Chen, K.S., Freedman, S.B., Games, D., Johnson-Wood, K., Lee, M., Zeller, M., Liu, W., Motter, R., Sinha, S., 2007. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J Biol Chem* 282, 26326-26334.
- McGovern, S.L., Helfand, B.T., Feng, B., Shoichet, B.K., 2003. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J. Med. Chem.* 46, 4265-4272.
- Minarini, A., Milelli, A., Tumiatti, V., Rosini, M., Simoni, E., Bolognesi, M.L., Andrisano, V., Bartolini, M., Motori, E., Angeloni, C., Hrelia, S., 2012. Cystamine-tacrine dimer: a new multi-target-directed ligand as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease treatment. *Neuropharmacol.* 62, 997-1003.
- Morphy, R., Kay, C., Rankovic, Z., 2004. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug. Discov. Today* 9, 641-651.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomed.* 14, 289-300.
- Naiki, H., Higuchi, K., Nakakuki, K., Takeda, T., 1991. Kinetic-Analysis of Amyloid Fibril Polymerization *In vitro*. *Laboratory Investigation* 65, 104-110.
- Naslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K.L., Davies, P., Greengard, P., Buxbaum, J.D., 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *Jama* 283, 1571-1577.
- Natarajan, S., Shunmugiah, K.P., Kasi, P.D., 2013. Plants traditionally used in age-related brain disorders (dementia): an ethnopharmacological survey. *Pharm Biol* 51, 492-523.
- Nicoli, R., Bartolini, M., Rudaz, S., Andrisano, V., Veuthey, J.L., 2008. Development of immobilized enzyme reactors based on human recombinant cytochrome P450 enzymes for phase I drug metabolism studies. *J. Chromatogr. A.* 1206, 2-10.
- Nordberg, A., 2006. Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 20, S12-18.
- Nordberg, A., Hellstrom-Lindahl, E., Lee, M., Johnson, M., Mousavi, M., Hall, R., Perry, E., Bednar, I., Court, J., 2002. Chronic nicotine treatment reduces beta-amyloidosis in

- the brain of a mouse model of Alzheimer's disease (APPsw). *J. Neurochem.* 81, 655-658.
- Oddo, S., Caccamo, A., Green, K.N., Liang, K., Tran, L., Chen, Y., Leslie, F.M., LaFerla, F.M., 2005. Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3046-3051.
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M., 2004. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res.* 75, 742-750.
- Ono, K., Hasegawa, K., Yamada, M., Naiki, H., 2002. Nicotine breaks down preformed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biol. Psychiatry.* 52, 880-886.
- Orhan, G., Orhan, I., Sener, B., 2006. Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. *Letters in Drug Des. Discov.* 3, 268-274.
- Orhan, I., Naz, Q., Kartal, M., Tosun, F., Sener, B., Choudhary, M.I., 2007. *In vitro* anticholinesterase activity of various alkaloids. *Z. Naturforsch. C* 62, 684-688.
- Orhan, I.E., 2012. Current Concepts on Selected Plant Secondary Metabolites With Promising Inhibitory Effects Against Enzymes Linked to Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.* 19, 2252-2261.
- Pakaski, M., Kalman, J., 2008. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 53, 103-111.
- Pallas, M., Camins, A., 2006. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 12, 4389-4408.
- Pappolla, M., Bozner, P., Soto, C., Shao, H., Robakis, N.K., Zagorski, M., Frangione, B., Ghiso, J., 1998. Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin. *J. Biol. Chem.* 273, 7185-7188.
- Park, S.Y., 2010. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1589-1609.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., Perry, R., 1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci* 22, 273-280.
- Perry, E.K., 1986. The Cholinergic Hypothesis - 10 Years On. *Brit Med Bull* 42, 63-69.
- Piazzini, L., Belluti, F., Bisi, A., Gobbi, S., Rizzo, S., Bartolini, M., Andrisano, V., Recanatini, M., Rampa, A., 2007a. Cholinesterase inhibitors: SAR and enzyme inhibitory activity of 3-[omega-(benzylmethylamino)alkoxy]xanthen-9-ones. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 575-585.
- Piazzini, L., Cavalli, A., Belluti, F., Bisi, A., Gobbi, S., Rizzo, S., Bartolini, M., Andrisano, V., Recanatini, M., Rampa, A., 2007b. Extensive SAR and computational studies of 3-{4-[(benzylmethylamino)methyl]phenyl}-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) derivatives. *J. Med. Chem.* 50, 4250-4254.
- Pinho, B.R., Ferreres, F., Valentao, P., Andrade, P.B., 2013. Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 1681-1700.
- Pohanka, M., 2011. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub* 155, 219-229.
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329-344.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., Govoni, S., 2004. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol. Res.* 50, 441-451.
- Rattmann, Y.D., Terluk, M.R., Souza, W.M., Santos, C.A.M., Biavatti, M.W., Torres, L.B., Mesia-Vela, S., Rieck, L., Silva-Santos, J.E., Marques, M.C.A., 2005. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. *J. Ethnopharmacol.* 100, 268-275.
- Ray, B., Lahiri, D.K., 2009. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: different molecular targets and potential therapeutic agents including curcumin. *Curr. Opi. Pharmacol.* 9, 434-444.

- Read, J., Suphioglu, C., 2013. Dropping the BACE: Beta Secretase (BACE1) as an Alzheimer's Disease Intervention Target. In: *Neurodegenerative Diseases* (ed U. Kishore), pp. 628. InTech Europe, Rijeka.
- Reichman, W.E., 2003. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. *Ann. Gen. Hosp. Psych.* 2, 1-14.
- Rufani, M., Filocamo, L., Lappa, S., Maggi, A., 1997. New acetylcholinesterase inhibitors. *Drugs Future* 22, 397.
- Ryan, A.J., Gray, N.M., Lowe, P.N., Chung, C.W., 2003. Effect of detergent on "promiscuous" inhibitors. *J. Med. Chem.* 46, 3448-3451.
- Sasaki, H., Miki, K., Kinoshita, K., Koyama, K., Juliawaty, L.D., Achmad, S.A., Hakim, E.H., Kaneda, M., Takahashi, K., 2010. beta-Secretase (BACE-1) inhibitory effect of biflavonoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 4558-4560.
- Sauder, J.M., Arthur, J.W., Dunbrack, R.L., Jr., 2000. Modeling of substrate specificity of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein beta-secretase. *J. Mol. Biol.* 300, 241-248.
- Seidl, C., Correia, B.L., Stinghen, A.E., Santos, C.A., 2010. Acetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. *Z. Naturforsch. C* 65, 440-444.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* 3, 75-80.
- Selkoe, D.J., 2004. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell. Biol.* 6, 1054-1061.
- Shimada, Y., Goto, H., Itoh, T., Sakakibara, I., Kubo, M., Sasaki, H., Terasawa, K., 1999. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 715-722.
- Silman, I., Sussman, J.L., 2005. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opi. Pharmacol.* 5, 293-302.
- Silva, G.L., Gaertner, P., Marson, P.G., Scharwz, E.A., Santos, C.A.M., 2004. An ethnopharmacobotanical survey in Salto Caxias Hydroelectric Power Plant in Paraná State, Brazil, before the flooding. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 23, 148-153.
- Silvestri, R., 2009. Boom in the development of non-peptidic beta-secretase (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Res. Rev.* 29, 295-338.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S.M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., John, V., 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.
- Small, S.A., Duff, K., 2008. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 60, 534-542.
- Souza, W.M., 2007. Estudo químico e das atividades biológicas dos alcaloides indólicos de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 176p.
- Souza, W.M., Brehmer, F., Nakao, L.S., Stinghen, A.E.M., Santos, C.A.M., 2007. Uleine effect on the production of nitric oxide in RAEC and B16F10 cells. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 191-196.
- Souza, W.M., Stinghen, A.E.M., Santos, C.A.M., 2004. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. *Fitoterapia* 75, 750-753.
- Stachel, S.J., Coburn, C.A., Steele, T.G., Jones, K.G., Loutzenhiser, E.F., Gregro, A.R., Rajapakse, H.A., Lai, M.T., Crouthamel, M.C., Xu, M., Tugusheva, K., Lineberger, J.E., Pietrak, B.L., Espeseth, A.S., Shi, X.P., Chen-Dodson, E., Holloway, M.K., Munshi, S., Simon, A.J., Kuo, L., Vacca, J.P., 2004. Structure-based design of potent and

- selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J. Med. Chem.* 47, 6447-6450.
- Strancar, A., Koselj, P., Schwinn, H., Josic, D., 1996. Application of compact porous disks for fast separations of biopolymers and in-process control in biotechnology. *Anal. Chem.* 68, 3483-3488.
- Tabaton, M., Tamagno, E., 2007. The molecular link between beta- and gamma-secretase activity on the amyloid beta precursor protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2211-2218.
- Viegas, C., Bolzani, V.D., Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M., 2005. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. *Mini-Rev. Med. Chem.* 5, 915-926.
- Wainer, I.W., Kaliszan, R., Noctor, T.A., 1993. Biochromatography using immobilized biopolymers: a new approach to the determination of pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 45 Suppl 1, 367-373.
- Wainer, I.W., Noctor, T.A.G., 1993. Molecular Biochromatography - an Approach to the Liquid-Chromatographic Determination of Ligand Biopolymer Interactions. *Adv. Chromatogr.* 33, 67-98.
- Wang, B.S., Wang, H., Wei, Z.H., Song, Y.Y., Zhang, L., Chen, H.Z., 2009. Efficacy and safety of natural acetylcholinesterase inhibitor huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *J. Neu. Transm.* 116, 457-465.
- Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., Haass, C., 2006. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666.
- Williams, P., Sorribas, A., Howes, M.J., 2011. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Nat. Prod. Rep.* 28, 48-77.
- Williams, P., Sorribas, A., Liang, Z., 2010. New methods to explore marine resources for Alzheimer's therapeutics. *Curr. Alzheimer. Res.* 7, 210-213.
- Wu, H.M., Tzeng, N.S., Qian, L., Wei, S.J., Hu, X., Chen, S.H., Rawls, S.M., Flood, P., Hong, J.S., Lu, R.B., 2009. Novel neuroprotective mechanisms of memantine: increase in neurotrophic factor release from astroglia and anti-inflammation by preventing microglial activation. *Neuropsychopharmacol.* 34, 2344-2357.
- Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P.P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschy, S.A., Cole, G.M., 2005. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 5892-5901.
- Yogev-Falach, M., Bar-Am, O., Amit, T., Weinreb, O., Youdim, M.B., 2006. A multifunctional, neuroprotective drug, ladostigil (TV3326), regulates holo-APP translation and processing. *Faseb. J.* 20, 2177-2179.
- Yoon, Y.K., Ali, M.A., Wei, A.C., Choon, T.S., Khaw, K.Y., Murugaiyah, V., Osman, H., Masand, V.H., 2013. Synthesis, characterization, and molecular docking analysis of novel benzimidazole derivatives as cholinesterase inhibitors. *Bioorg. Chem.* 49, 33-39.
- Zhang, H.Y., 2005. One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *Febs. Letters* 579, 5260-5264.
- Zurek, E., Szymanski, P., Mikiciuk-Olasik, E., 2013. Synthesis and biological activity of new donepezil-hydrazinonicotinamide hybrids. *Drug. Res. (Stuttg)* 63, 137-144.