

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**HIBRIDAÇÃO MOLECULAR COMO ESTRATÉGIA DE
PLANEJAMENTO DE MOLÉCULAS MULTIALVO PARA
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Kamila Hitomi Garan

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo.

Orientador(a):

Prof.(a). Dr(a) Roberto Parise Filho

São Paulo

2023

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	3
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	5
RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Doença de Alzheimer	7
1.2 Fisiopatologia da doença	8
1.2.1 Hipótese colinérgica	8
1.2.2 Hipótese amiloidogênica	8
1.2.3 Hipótese da hiperfosforilação da proteína tau	9
1.3 Terapia atual	10
1.4 Hibridação molecular	12
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 Fármacos multialvo: moléculas híbridas no tratamento da doença de Alzheimer	14
4.1.1 Tacrina e ebselen	17
4.1.2 Tacrina e 2-fenilbenzotiazol (PhBTA)	19
4.1.3 Tacrina e flurbiprofeno	21
4.1.4 Donepezila e RS67333	23
4.1.5 8-Hidroxiquinolina, donepezila e propargilamina	26
4.1.6 Galantamina e memantina	29
4.1.7 Ladostigil	31
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	Food and Drug Administration
DA	Doença de Alzheimer
MS	Ministério da Saúde
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
APP	Amyloid precursor protein (Proteína precursora amilóide)
NFT	Neurofibrillary tangles (Emaranhados neurofibrilares)
IAChE	Inibidores da acetilcolinesterase
NMDA	N-metil-D-aspartato
BHE	Barreira hemato-encefálica
BuChE	Butirilcolinesterase
CAS	Catalytic active site (Sítio ativo catalítico)
PAS	Peripheral anionic site (Sítio aniónico periférico)
EROS	Espécies restiavas de oxigênio
βA	B-amilóide
Tyr	Tyrosine (Tirosina)
Asp	Aspartic acid (Ácido aspártico)
Trp	Tryptophan (Triptofano)
Phe	Phenylalanine (Fenilalanina)
Lys	Lysine (Lisina)
His	Histidine (Histidina)
SNC	Sistema nervoso central
TAC	Tacrina
PhBTA	2-fenilbenzotiazol
AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
PS-1	Presenilina-1
MAO	Monoamine oxidase
ELISA	Enzyme-linked immune sandwich assay
AMPc	Adenosina 3',5' - monofosfato cíclico
PKA	Protein kinase A (Proteína quinase A)
5-HT4	5-hidroxitriptamina 4

5-HT _R	Receptor 5-hidroxitriptamina 4
TcAChE	<i>Torpedo californica</i> acetilcolinesterase
μM	Milimolar
nM	Nanomolar
GOLD	Genetic Optimisation for Ligand Docking

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da hipótese amilóide

Figura 2 – Hipóteses da doença de Alzheimer

Figura 3 – Fármacos aprovados pela ANVISA para o tratamento da doença de Alzheimer

Figura 4 – Estratégias de hibridação molecular com IAChE

Figura 5 – Representação da disposição dos principais aminoácidos do CAS (tríade catalítica e sítio aniónico) e PAS

Figura 6 – Hibridação da tacrina com ebselen

Figura 7 – Interação entre o híbrido da tacrina com ebselen com a AChE

Figura 8 – Hibridação tacrina com 2-fenilbenzotiazol

Figura 9 – Interação do híbrido da tacrina e 2-fenilbenzotiazol com a AChE

Figura 10 – Hibridação entre a tacrina e o flurbiprofeno

Figura 11 – Interação entre o híbrido da tacrina e flurbiprofeno com a AChE

Figura 12 – Hibridação entre a donepezila e o RS67333

Figura 13 – Interação entre a Donecobrida com a ACh

Figura 14 – Hibridação da donepezila com 8-hidroxiquinolina

Figura 15 – Interação entre o híbrido de donepezila e 8-hidroxiquinolina com a AChE

Figura 16 – Hibridação da galantamina e memantina

Figura 17 – Interação do memagal com a AChE

Figura 18 – Hibridação da rivastigmina com rasagilina formando o ladostigil

RESUMO

GARAN, K.H. **Hibridação molecular como estratégia de planejamento de moléculas multialvo para tratamento da doença de Alzheimer.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Hibridação, Fármacos multialvo e Inibidores de AChE

Introdução: O caráter multifatorial da Doença de Alzheimer (DA) exige estratégias que direcionem os fármacos para atuarem em mais de um alvo biológico para a melhora ou retardo do aparecimento dos sintomas da doença. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi elaborar uma revisão bibliográfica sobre os avanços mais recentes no uso da hibridação molecular para o planejamento de fármacos multialvo no tratamento da DA. **Materiais e métodos:** Foram realizadas buscas de artigos sobre o uso da hibridação molecular para o tratamento multialvo da DA, os quais foram publicados no período de 2000 a 2022, extraídos de bases de dados como PubMed, ScienceDirect, Scopus e Portal de Periódicos Capes. As palavras-chave em português e inglês foram: Doença de Alzheimer, Hibridação, Fármacos multialvo e Inibidores de AChE. **Resultados:** Os compostos híbridos identificados revelaram resultados promissores em estudos *in vitro*, especialmente aqueles gerados da combinação de tacrina com ebselen e memagal, que demonstraram as taxas mais elevadas de inibição da AChE e BuAChE. Além disso, a hibridação envolvendo 8-hidroxiquinolina, donepezila e propargilamina, apesar de não apresentar uma inibição significativa das enzimas, exibiu atividade quelante e inibidor das MAOs, sugerindo que, *in vivo*, pode ser um candidato promissor para investigações futuras. Uma avaliação mais aprofundada das questões de toxicidade relacionadas aos híbridos que surgiram de antagonistas de NMDA e de inibidores de MAOs, a fim de equilibrar adequadamente os riscos e benefícios associados a esses compostos. **Conclusão:** Após a revisão bibliográfica, conclui-se que os híbridos analisados apresentaram bons resultados *in vitro*, mas ainda necessitam de mais estudo para se tornarem potentes candidatos a fármacos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma disfunção neurodegenerativa progressiva e incapacitante a qual afeta, principalmente, populações com mais de 60 anos de idade. Estima-se que na população mundial, cerca de 57 milhões de pessoas apresentam algum tipo de demência e esse número triplicaria para 152 milhões até o ano de 2050 (NICHOLS et al., 2022). Em 2022, estimou-se que 10,7% da população estadunidense com mais de 65 anos de idade possui a DA, valor que aumenta progressivamente com idade, chegando a 33,2% da população com mais de 85 anos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022; RAJAN et al., 2021). No Brasil, estudos epidemiológicos sobre a incidência da doença no país ainda são escassos, mas com o aumento da população idosa, a incidência de doenças que afetam mais essa faixa etária, como a DA, também se demonstra aumentada (SCAZUFCA et al., 2002). Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2022), no período de 2012 a 2021, a parcela da população com mais de 60 anos aumentou de 22,3 milhões de pessoas para 31,2 milhões (crescimento de 39,8%).

O diagnóstico clínico da DA estabelecido pelo Ministério da Saúde (MS) é caracterizado pelo comprometimento da memória, do raciocínio, dificuldade de comunicação e deturpação comportamental. Os sintomas são acompanhados, laboratorialmente, pelo acúmulo extracelular da proteína tau e β -amiloide, morte neuronal, diminuição de impulsos sinápticos e atrofia cortical (CALDERON-GARCIDUEÑAS; DUYCKAERTS, 2018). Para explicar as diversas manifestações ocasionadas por essa doença multifatorial, diversas hipóteses sobre o seu desenvolvimento ainda estão em discussão, entre as principais até o momento, a hipótese colinérgica, amiloidogênica, da hiperfosforilação da proteína tau, da cascata mitocondrial, da homeostasia de cálcio, neurovascular e inflamatória (LIU et al., 2019).

1.2 Fisiopatologia da doença

1.2.1 Hipótese colinérgica

Uma das principais causas do desenvolvimento da DA é a diminuição da inervação colinérgica no prosencéfalo basal, a qual ocorre devido a alterações neurodegenerativas durante o envelhecimento, podendo estar relacionada à disfunção memorial causada pela doença (SCHLIEBS; ARENDT, 2011). Nos neurônios pré-sinápticos colinérgicos, ocorre a síntese da acetilcolina (ACh) a partir de colina e acetil-coenzima A, por meio da enzima colina acetiltransferase (CAT). Neste mecanismo, o neurotransmissor é transportado por meio de vesículas para a fenda sináptica quando ocorre o estímulo de despolarização dos neurônios. Quando liberada, a ACh é decomposta pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato, podendo a primeira ser captada e usada na síntese de mais ACh (JU; TAM, 2022).

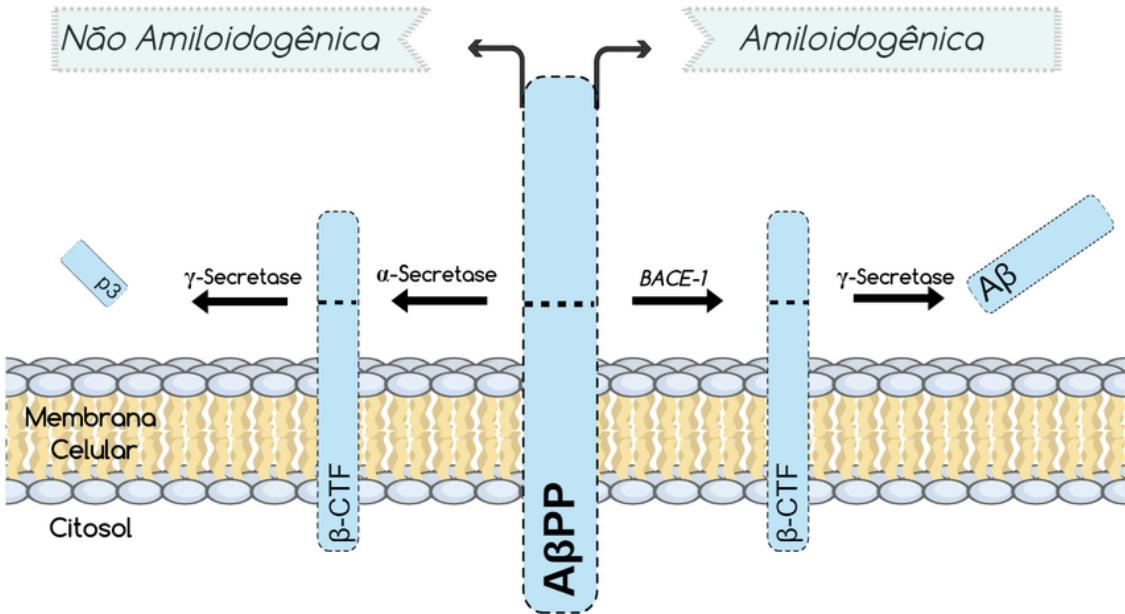
As evidências apontam para a diminuição da concentração da colina acetiltransferase (CAT) em pacientes com doença de Alzheimer, bem como para a redução de acetilcolina (ACh) no líquido cefalorraquidiano cortical do cérebro. Essa condição está correlacionada com os déficits cognitivos observados nos pacientes (LIU et al., 2019).

1.2.2 Hipótese amiloidogênica

Outra característica encontrada em pacientes com a DA é a presença de placas insolúveis da proteína β -amiloide depositadas em diferentes regiões do córtex cerebral, as quais definem as diversas fases da doença (CALDERON-GARCIDUEÑAS; DUYCKAERTS, 2018). A produção dessa proteína ocorre devido à mutação no gene βA da proteína precursora de amiloide (do inglês, *amyloid precursor protein* - APP) no cromossomo 21, o que impede que a clivagem proteolítica da APP ocorra pela α -secretase e passe a ser degradada de forma errônea pela β -secretase (BACE1), seguida da γ -secretase (Figura 1) (SMITH, 1998). Desta maneira, são formadas proteínas β -amiloides insolúveis de diferentes tamanhos que se acumulam em espaços extracelulares e em paredes vasculares cerebrais, sendo que, em altas concentrações,

esses emaranhados são neurotóxicos, podendo causar atrofia dendrítica, axonal, seguida da morte do neurônio (HARMAN, 1996; KHAN; BARVE; KUMAR, 2020).

Figura 1 - Esquema da hipótese amilóide



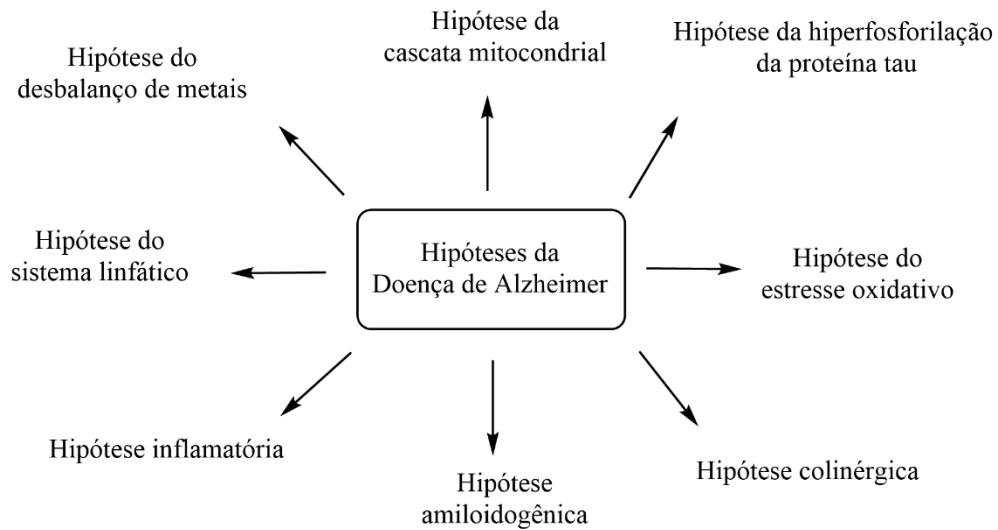
Fonte: DELANOGARE et al., 2019

1.2.3 Hipótese da hiperfosforilação da proteína tau

As proteínas tau são substâncias neuronais que possuem domínio de ligação aos microtúbulos de dendritos e axônios, possuindo a função de estabilização daquela estrutura, mantendo a integridade do citoesqueleto neuronal. Tal ligação é dependente da fosforilação dessas proteínas por quinases como a glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) e quinase-5 dependente de ciclina (CDK5) (FROST; JACKS; DIAMOND, 2009). Entretanto, em uma situação de hiperfosforilação da proteína tau por aquelas enzimas, ocorre a diminuição da afinidade pelos microtúbulos, favorecendo a formação de emaranhados neurofibrilares (do inglês, *neurofibrillary tangles* - NFTs), os quais se depositam no citosol e invalidam a atividade da proteína, acarretando a morte neuronal (Figura 2) (CREWS; MASLIAH; MASLIAH, 2014).

Outras hipóteses relacionam o desenvolvimento dos sintomas com diversos desbalanços fisiológicos, como a variação da concentração de radicais livres e metais, alteração da expressão de enzimas e proteínas, elevação da resposta imune, processos inflamatórios exacerbados e deficiência do sistema linfático (Figura 2) (LIU et al., 2019). Entretanto, tratando-se de uma doença multifatorial complexa, mesmo com essas desregulações presentes em pacientes com a doença, é difícil a sua correlação direta com o desenvolvimento da DA, fato que torna grande parte das hipóteses incertas em relação a etiologia da doença (DAS; RAYMICK; SARKAR, 2021; LIU et al., 2019).

Figura 2 – Hipóteses da doença de Alzheimer



Fonte: elaborado pela autora

1.3 Terapia atual

Atualmente, o tratamento da DA consiste na estabilização dos sintomas e no retardar da progressão da doença, atuando com o mínimo de efeitos adversos. Por se tratar de uma doença multifatorial, diversos alvos moleculares foram e ainda estão sendo estudados para o tratamento farmacológico da DA, o qual varia dependendo do estágio da doença (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022).

Neste contexto, o tratamento convencional adotado e recomendado por importantes órgãos de saúde, como a ANVISA e FDA (*Food and Drug Administration*), incluem duas principais classes farmacológicas, os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) e antagonistas dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) (Figura 3) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2019).

Os AChE, considerando a hipótese colinérgica, não atuar diminuindo os sintomas de distúrbios cognitivos e comportamentais nos estágios leves a moderados da doença. Esses resultados ocorrem devido à inibição da AChE na fenda sináptica, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina, levando ao aumento da meia-vida desse neurotransmissor e, assim, potencializando a transmissão sináptica colinérgica (CHU, 2012). Até o momento, os AChE aprovados pelos principais órgãos de saúde incluem a donepezila, galantamina e rivastigmina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2019).

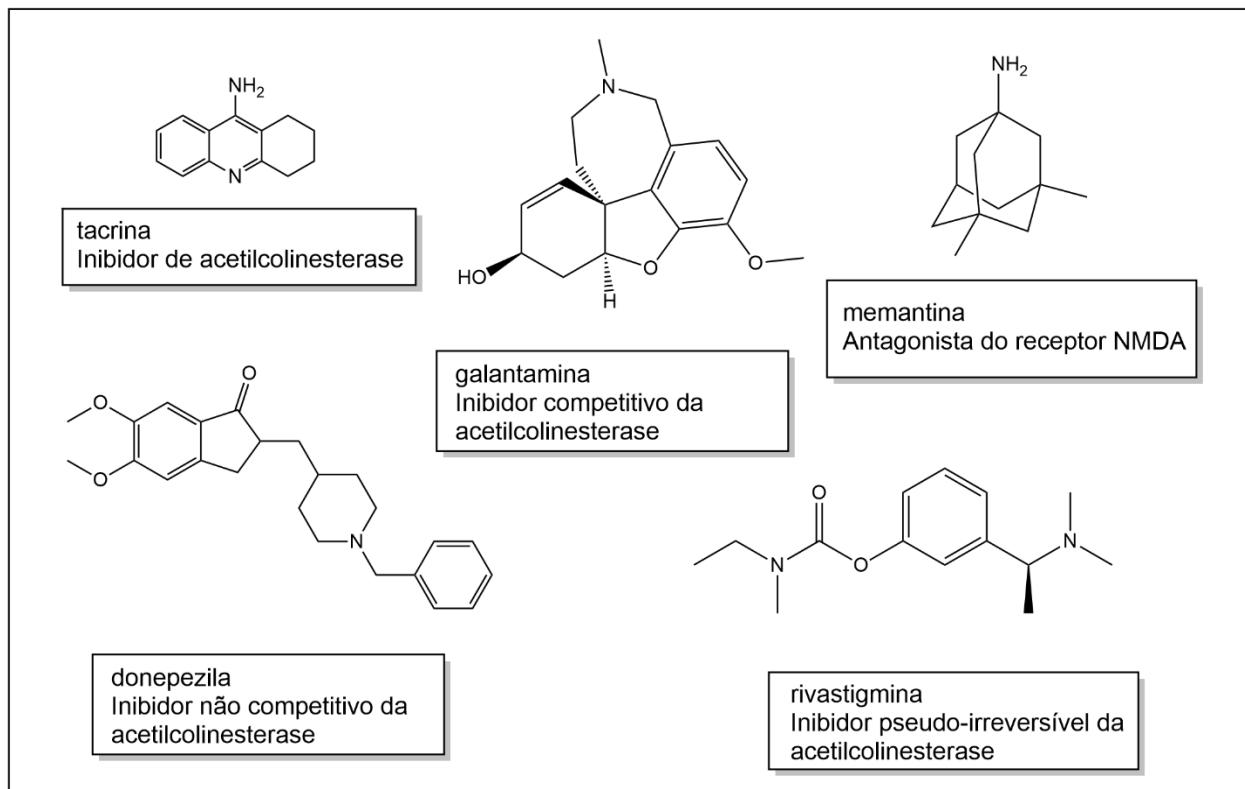
O primeiro fármaco aprovado pelo FDA para o tratamento da DA foi a tacrina em 1993 e, devido a sua alta lipossolubilidade, possui elevada capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) e atuar na inibição dupla da AChE e butirilcolinesterase (BuChE), melhorando os sintomas da doença nos casos leves a moderados. Entretanto, por ocasionar diversos efeitos colaterais, como hepatotoxicidade, em 2013, foi retirado do tratamento da DA (CHALUPOVA et al., 2019; TUMIATTI et al., 2010).

A galantamina é um alcalóide com ação dupla, a qual atua como inibidor seletivo e competitivo da AChE e modulando alostericamente receptores nicotínicos, resultando na ativação colinérgica e melhorando os sintomas da doença (PRVULOVIC; HAMPEL; PANTEL, 2010). A rivastigmina é um inibidor pseudo-reversível não competitivo da AChE, como também da BuChE, sendo usada, também, para o tratamento dos sintomas leves a moderados da doença (TOUCHON et al., 2006; UNZETA et al., 2016). A donepezila é um inibidor reversível e não competitivo com alta seletividade para a AChE, quando comparada com BuChE, sendo, dessa forma, a molécula mais prescrita para o tratamento dos sintomas da doença DA (TOUCHON et al., 2006; UNZETA et al., 2016).

Por outro lado, acredita-se que a morte neuronal originada na DA tem forte contribuição da superestimulação de receptores de aminoácidos excitatórios, como o de

glutamato (LIPTON; ROSENBERG, 2013). Essa lesão celular possivelmente está relacionada com o excessivo influxo de cálcio causado, principalmente, pelos receptores do subtipo NMDA (mais permeáveis por íons de cálcio), levando a uma excitotoxicidade que culmina na formação de radicais livres, os quais são danosos às células neuronais (LIPTON, 2004; ROGAWSKI; WENK, 2003). Desta forma, faz sentido o uso de antagonistas não-competitivos dos receptores de NMDA para diminuir os danos de neurônios, sendo que o único utilizado para o tratamento da DA é a memantina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2019).

Figura 3 – Fármacos aprovados, com exceção da tacrina, para o tratamento da doença de Alzheimer



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

1.4 Hibridação Molecular

Atualmente, novas estratégias para o tratamento da DA estão sendo avaliadas, entre elas, o uso da imunoterapia, moduladores de secretase, antioxidantes, agentes

neuroprotetores, ligantes amiloides e, em particular, terapias multialvos (VAZ; SILVESTRE, 2020). Nesse último caso, com avanços obtidos na fisiopatologia da DA, diversos outros alvos moleculares estão sendo relacionados com o desenvolvimento da doença e, por essa razão, torna-se ainda mais válido o uso da polifarmacologia como estratégia terapêutica, a fim de combinar em um único fármaco diferentes arcabouços químicos que modulam diferentes alvos farmacológicos, possibilitando a ação em múltiplos alvos de forma simultânea (MAKHOBA et al., 2020).

O uso da hibridação molecular, ou seja, a ligação de dois ou mais arcabouços químicos em uma única molécula por meio de ligação covalente, tem como objetivo a ação sinérgica e/ou aditiva entre eles, podendo ser possível a redução da dose e, assim, a diminuição da toxicidade do fármaco, se comparado com a administração separada de cada um deles, como também a redução da resposta de resistência para cada um desses fármacos (NEPALI et al., 2014; BOLOGNESI, 2013). Ainda, no caso de uso de mais de um medicamento (polifarmácia) como forma de se atingir a eficácia desejada, chances de aparecimento de efeitos adversos e interações medicamentosas podem limitar a adesão ao tratamento (BOLOGNESI, 2013). Assim, é clara a vantagem do uso da hibridação molecular como planejamento de fármacos para o tratamento de doenças multialvos complexas, o que é representado por uma porcentagem de 21% de fármacos multialvos aprovados pelo FDA em uma análise de novas entidades moleculares aprovadas pelo órgão no período de 2015 a 2017 (RAMSAY et al., 2018).

Dado todo o contexto e a prevalência da DA na população mundial, a busca por tratamentos mais eficazes para a doença é de grande relevância (WEINREB et al., 2012). Nos últimos 20 anos, diversos estudos promissores em fases pré-clínicas já abordam o uso da hibridação molecular no tratamento multialvo para o aumento da potência na estabilização dos sintomas da DA e alguns deles serão abordados durante todo esse trabalho.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é elaborar uma revisão bibliográfica sobre os avanços mais recentes no uso da hibridação molecular para o planejamento de fármacos multialvo

no tratamento da DA. Esta análise leva em consideração não apenas a fisiopatologia da doença, mas também os mecanismos de ação dos tratamentos convencionais atualmente adotados, além dos resultados pré-clínicos relevantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram feitas buscas de artigos e periódicos a respeito do uso da hibridação molecular para o tratamento multialvo da DA, os quais foram publicados no período de 2000 a 2022, extraídos de bases de dados como PubMed, ScienceDirect, Scopus e Portal de Periódicos Capes. A pesquisa foi realizada utilizando as palavras-chave, em português e inglês: Doença de Alzheimer, Hibridação, Fármacos multialvo e inibidores de Acetilcolinesterase.

A coleta de dados foi feita por uma triagem inicial utilizando como parâmetro o título e o resumo dos artigos coletados, os quais posteriormente foram selecionados e lidos na íntegra. Ainda, artigos referenciados nos estudos selecionados também foram consultados nas referências bibliográficas.

Foram incluídos neste trabalho artigos que tratem a respeito do planejamento de novos fármacos usando a hibridação molecular para o tratamento multialvo da doença de Alzheimer e que estejam em estudos pré-clínicos. Por outro lado, foram excluídos artigos que não abordaram o uso da hibridação molecular como forma de planejamento de fármacos para a DA, como também tratamentos que não atuavam como multialvos. Artigos em fase de estudos clínicos também não foram considerados neste presente trabalho.

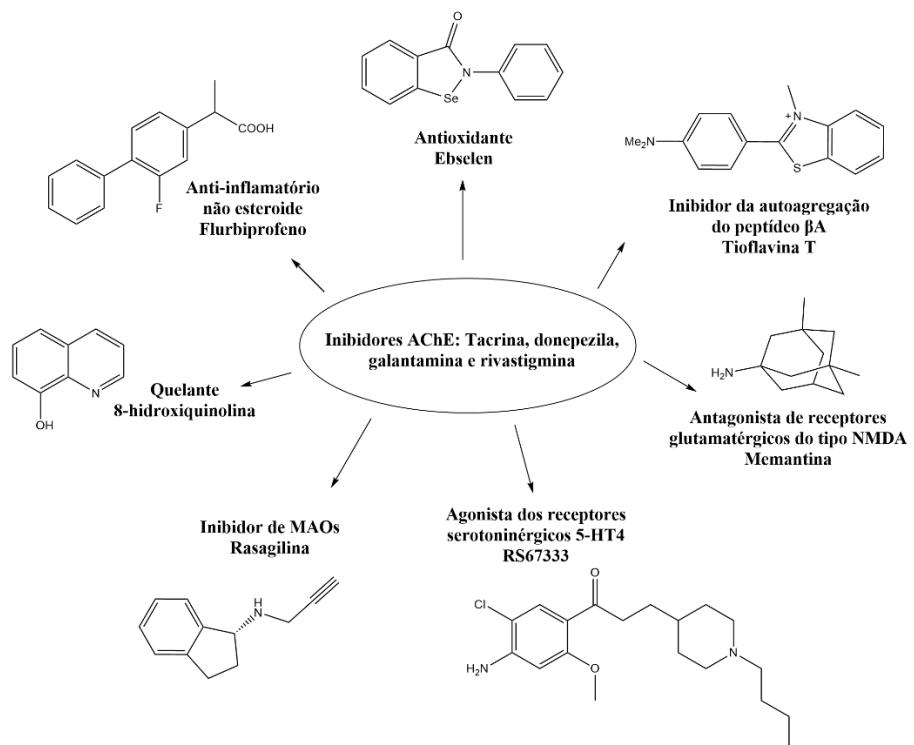
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Moléculas híbridas no tratamento da doença de Alzheimer

Considerando a complexidade multifatorial da Doença de Alzheimer (DA), novas abordagens terapêuticas têm sido exploradas, sendo os ligantes direcionados a múltiplos alvos uma estratégia emergente na descoberta de agentes inovadores. Em uma análise dos estudos pertinentes, destaca-se a criação de Inibidores da Acetilcolinesterase (AChE) planejados por meio de hibridação com outras moléculas que atuam

simultaneamente em um segundo alvo ou de maneira complementar às regiões da enzima AChE (LI et al., 2018). No contexto do presente estudo, foram investigadas sete estratégias distintas, a saber: moléculas com atividade antioxidante, inibidores da autoagregação do peptídeo β A, anti-inflamatórios não esteroides, agonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT4, quelantes, antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e inibidores da Monoamina Oxidase (MAOs) (Figura 4).

Figura 4 – Estratégias de hibridação molecular com IAChE



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

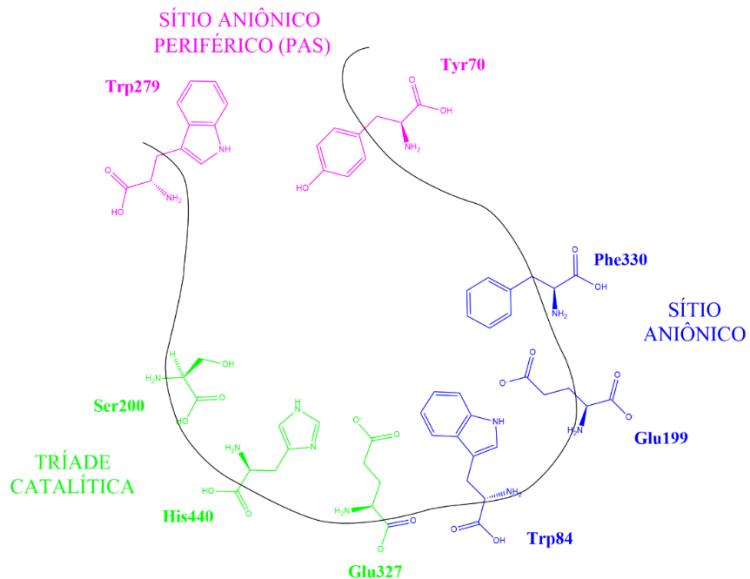
Os IAChE, em sua grande maioria, possuem ação de inibitória mista da AChE e BuChE (GREIG; LAHIRI; SAMBAMURTI, 2002). Ambas as enzimas possuem a capacidade de degradação da ACh, entretanto, o papel fisiológico da BuChE ainda não está claramente elucidado, sabendo-se que em estágios avançados da DA, a concentração dessa enzima parece estar aumentada e associada com a formação de placas senis (GREIG; LAHIRI; SAMBAMURTI, 2002).

Em contrapartida, a AChE é amplamente estudada e a sua estrutura é constituída por duas regiões importantes, a saber: i) sítio ativo catalítico (do inglês, *catalytic active*

site - CAS), localizado no interior de um estreito bolsão responsável pela degradação da ACh; ii) sítio aniônico periférico (do inglês, *peripheral anionic site* - PAS) o qual encontra-se na região superior do bolsão e gera um complexo estável com o peptídeo β -amilóide que acelera a oligomerização e a agregação de placas senis (POURSHOJAEI et al., 2019; TANOLI et al., 2019).

O CAS é formado por uma tríade catalítica importante constituída por Ser200, His440 e Glu327 (Figura 5 – verde) e uma parte aniónica que possui resíduos de Phe330, Trp84 e Glu199 (Figura 5 – azul). Já o PAS é formado por Trp279 e Tyr70 (sequência de numeração da AchE de *Torpedo californica* ou TcAChE), os quais estão presentes entrada do bolsão da enzima, agindo de forma alostérica no impedimento da passagem da ACh para o sítio ativo (Figura 5 - rosa). Por esse motivo, atualmente, os IAChEs mais estudados apresentam a capacidade de interação dupla com ambas as regiões, conferindo maior seletividade e capacidade inbitória da enzima (KERI et al., 2013; RAJESHWARI et al., 2019).

Figura 5 – Representação da disposição dos principais aminoácidos do CAS (tríade catalítica e sítio aniónico) e PAS



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

4.1.1 Tacrina e Ebselen

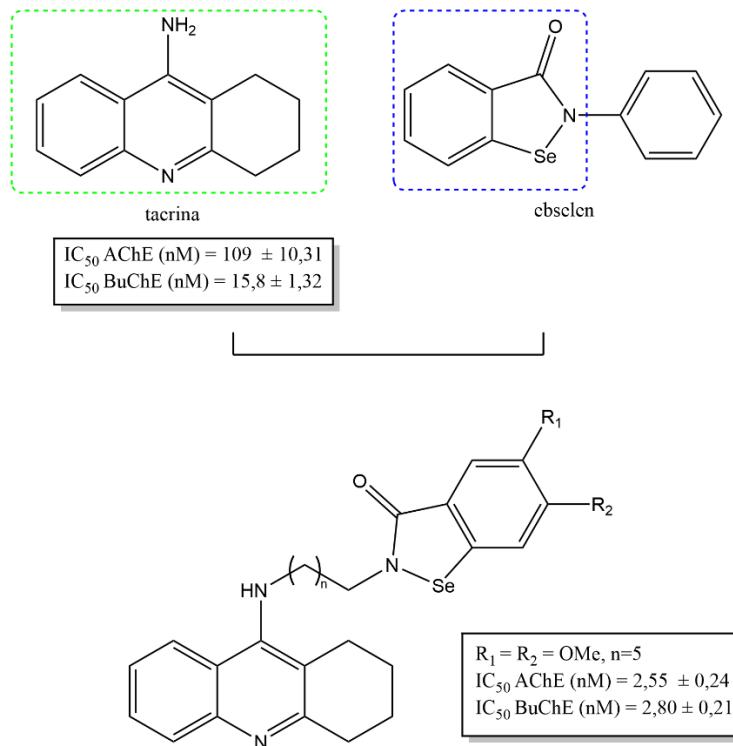
A tacrina tem sido utilizada como molécula central em pesquisas que envolvem a hibridação molecular. Contudo, sua toxicidade hepática ainda não foi completamente compreendida, o que representa um desafio significativo. Um aspecto crucial nesse contexto é a presença do grupo amina primária livre na estrutura da tacrina. Portanto, estudos tem explorado a tacrina como ponto de partida para a criação de moléculas multifuncionais por meio da hibridação molecular. Esta abordagem visa modular sua toxicidade, substituindo o grupo amina por fragmentos funcionais. Dessa forma, busca-se reduzir a hepatotoxicidade associada à molécula, abrindo caminho para aplicações terapêuticas mais seguras e eficazes. (WU et al., 2016).

O ebselen é um composto organoselenado que possui a capacidade de mimetizar a ação antioxidante e anti-inflamatória das glutationas peroxidases por meio de uma simples reação com peroxinitrito decompondo moléculas de dióxido de hidrogênio (H_2O_2) e assim evitar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem causar o dano celular (UDDIN et al., 2021; WU et al., 2016).

Nesse contexto, no estudo de Mao et al., 2013, foram sintetizadas moléculas híbridas utilizando o grupo farmacofórico do ebselen e a tacrina, os quais foram ligados por meio de espaçantes alquílicos (Figura 6) (MAO et al., 2013; UDDIN et al., 2021).

No estudo de Mao et al., os compostos foram avaliados frente à inibição enzimática *in vitro* de AChE e BuChE e verificou-se que moléculas com substituições do tipo metóxi na região aromática do ebselen e com espaçantes contendo cinco a nove carbonos (Figura 6) obtiveram maior inibição da AChE e BuChE se comparados com espaçantes de cadeias menores. Contudo, a inibição máxima de ambas as enzimas aconteceu para compostos com espaçantes contendo seis carbonos. Nesse estudo, o composto apresentou ação mista, ligando-se simultaneamente no local de ligação aniónico periférico (PAS) e no sítio catalítico ativo (CAS) da enzima AChE, sendo capaz de inibir a auto agregação e a agregação induzida do peptídeo β A (MAO et al., 2013).

Figura 6 – Hibridação da tacrina com ebselen



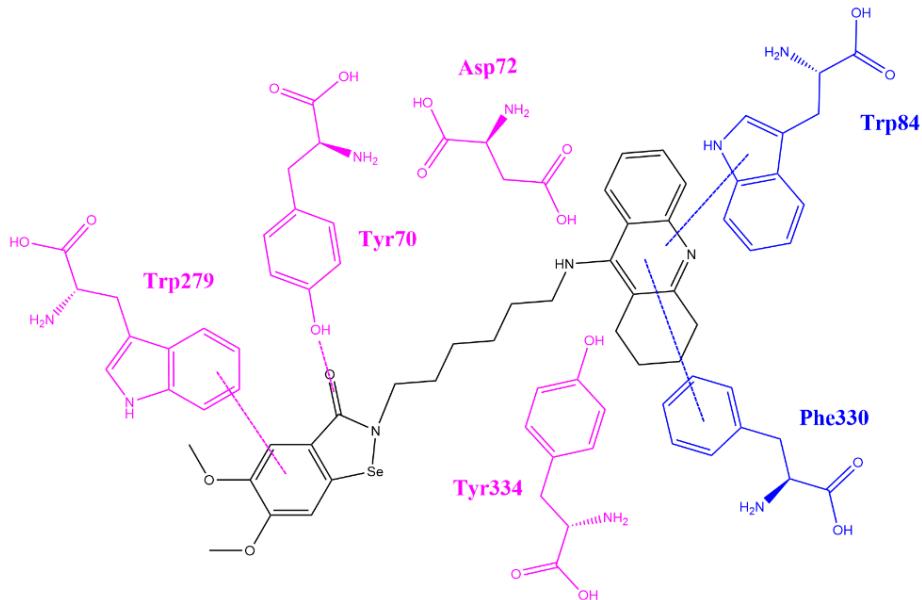
Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Para investigar a interação entre a molécula e o receptor, no estudo, foram realizadas simulações de docking molecular, utilizando o programa CDOCKER no software Discovery Studio 2.1 (Figura 7). Observaram-se interações na região tricíclica da tacrina, envolvendo o empilhamento π-π com Trp84 e Phe330 na região CAS da enzima. Além disso, o anel benzênico da região 1,2-benzisosselenazol-3(2H)-ona interage com Trp279 do PAS por meio de empilhamento π-π, enquanto a carbonila estabelece uma ligação de hidrogênio com Tyr70. Adicionalmente, o ligante metíleno da cadeia longa da molécula apresenta interações hidrofóbicas com os aminoácidos Tyr334, Tyr70 e Asp72 (MAO et al., 2013).

Além de inibir de forma mais eficaz as enzimas AChE e BuChEs em comparação com a tacrina, o híbrido também demonstrou ação contra a formação de radicais livres, conforme evidenciado pelos ensaios de peroxidase e de atividade de eliminação de peroxinitrito. A molécula revelou-se eficaz na redução de mais de 80% na formação de

peróxido de hidrogênio e peroxinitrito. Além disso, o composto híbrido foi avaliado quanto à sua hepatotoxicidade, demonstrando que em concentrações mais elevadas, a viabilidade celular é maior do que na presença de tacrina, indicando assim menor toxicidade hepática (MAO et al., 2013).

Figura 7 – Interação entre o híbrido da tacrina com ebselen com a ACh



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

4.1.2 Tacrina e 2-fenilbenzotiazol (PhBTA)

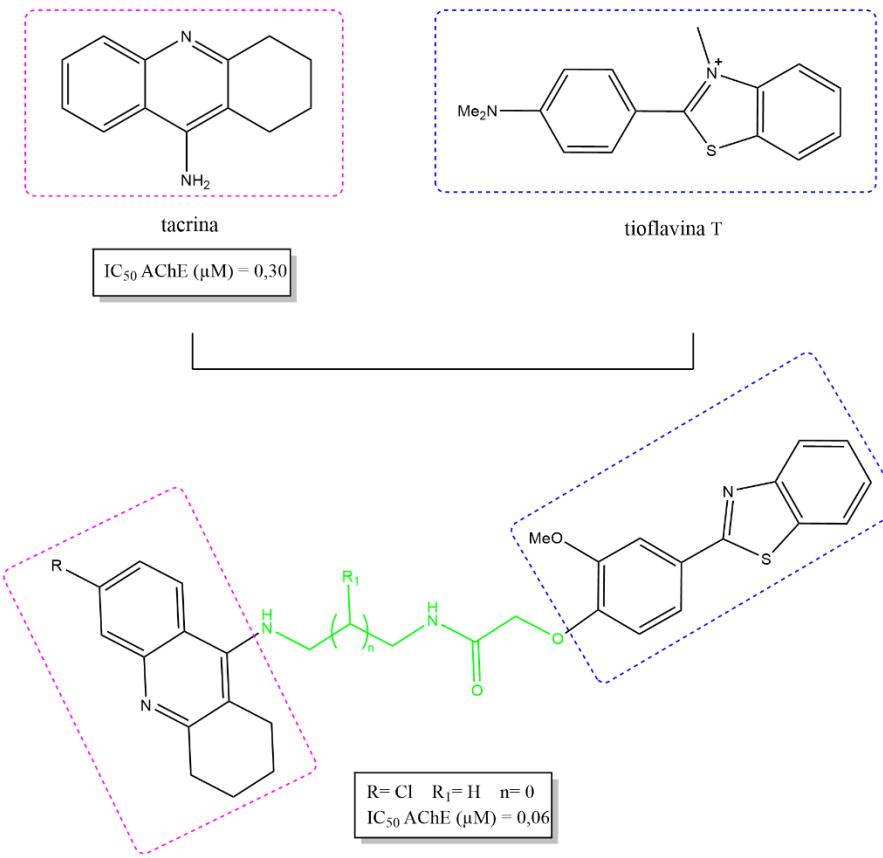
Outros estudos investigaram a hibridação molecular entre a tacrina e compostos benzotiazólicos, que consistem em um sistema com um anel benzênico fusionado a um anel tiazólico contendo nitrogênio e enxofre. Esses compostos exibem uma variedade de efeitos biológicos, incluindo atividade no sistema nervoso central (SNC) (HROCH et al., 2015).

Rajeshwari e sua equipe relataram em seu estudo que, devido à analogia da porção 2-fenilbenzotiazol com o marcador de proteína β A Tioflavina T (ThT), vários derivados testados agiram como agentes de imagem dessas placas de proteínas. Por essa razão, o pesquisador realizou a hibridação da porção 2-fenilbenzotiazol com a tacrina, utilizando como protótipo a molécula de ThT (Figura 8), incluindo um substituinte

metoxi com a finalidade de equilibrar o caráter hidrofóbico da molécula e fornecer a capacidade pró-quelante de proteínas β A (RAJESHWARI et al., 2019).

O teste de inibição da AChE foi realizado *in vitro* utilizando a TcAChE, e a interação da molécula com o receptor foi testada por simulações de docking molecular utilizando o programa GOLD (CCDC Software Ltd.). Os compostos que apresentaram melhor desempenho demonstraram maior inibição da enzima ($IC_{50} = 0,06 \mu M$) em comparação com a tacrina ($IC_{50} = 0,30 \mu M$). A melhoria na performance foi atribuída à substituição com cloro e ao tamanho ideal de dois carbonos como espaçador, permitindo acomodar o composto TAC-PhBTA ao longo da cavidade hidrofóbica da enzima e bloquear a entrada da ACh no sítio ativo da enzima (KERI et al., 2013; RAJESHWARI et al., 2019).

Figura 8 – Hibridação tacrina com 2-fenilbenzotiazol

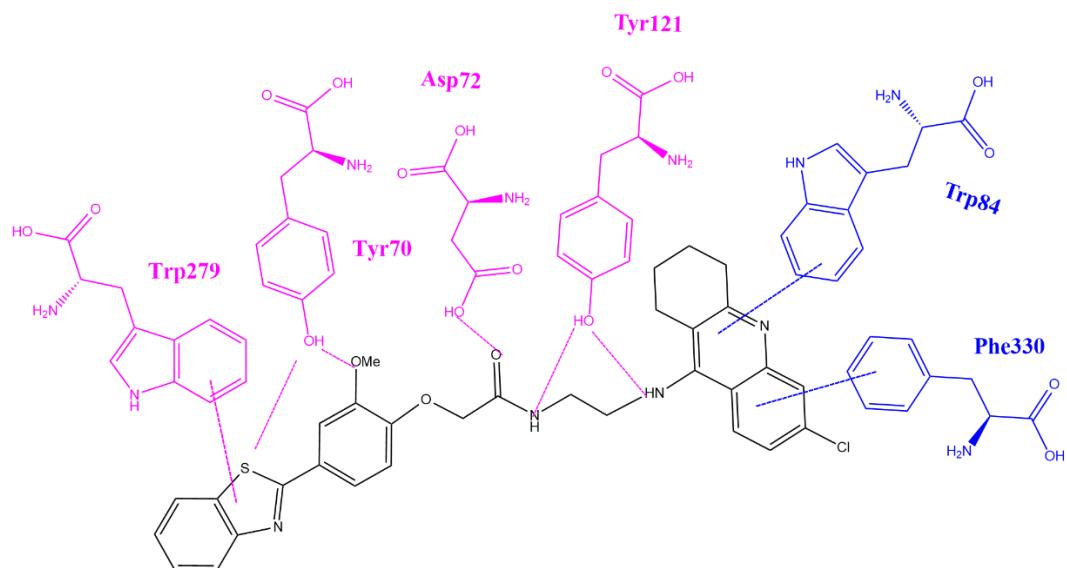


Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Por isso, durante o estudo de viabilidade, observou-se que a natureza lipofílica e a presença do ligante metóxi permitiram a ligação da tacrina aos anéis aromáticos do

CAS por empilhamento π - π e com a região PAS por interação de empilhamento aromático com Tyr70 e Trp279, reforçando as interações com a enzima. Além disso, todos os inibidores projetados mostraram ligações de hidrogênio extras com diferentes aminoácidos (Figura 9). O composto que apresentou o melhor resultado de inibição da AChE interagiu com o átomo de enxofre do benzotiazol por meio de ligações de hidrogênio com Tyr70, e o grupo amídico mostrou interações de hidrogênio com Asp72 e Tyr121 (Figura 9) (RAJESHWARI et al., 2019).

Figura 9 – Interação do híbrido da tacrina e 2-fenilbenzotiazol com a ACh



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Com a finalidade de determinar o potencial inibitório dos híbridos de autoagregação do peptídeo β A, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando a emissão de fluorescência do ThT. Além da ação sobre a AChE, os híbridos também apresentaram valores de inibição na faixa de 27–44,6%, enquanto a tacrina isolada exibiu um valor de inibição de 11%, independentemente da concentração utilizada nos ensaios (RAJESHWARI et al., 2019).

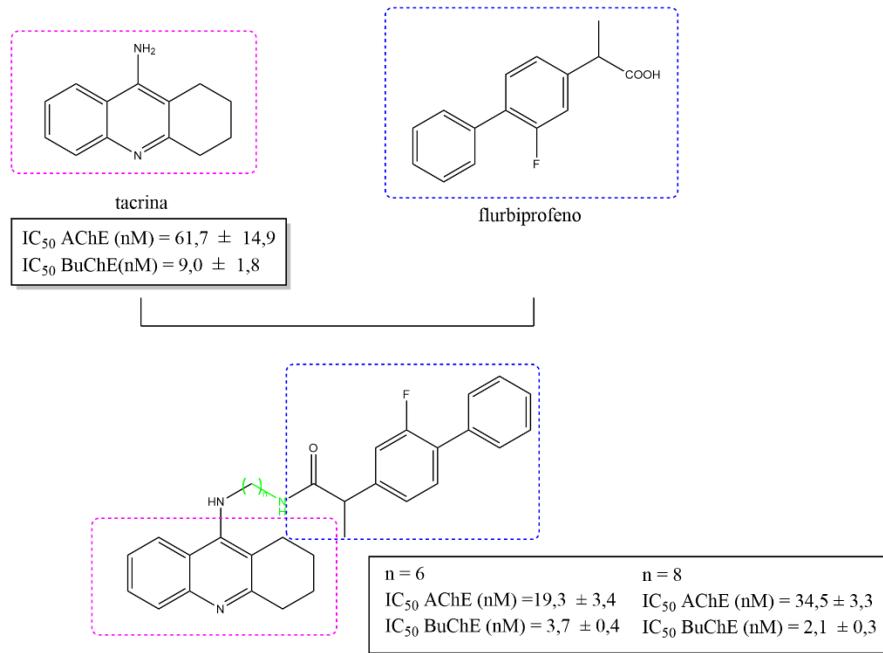
4.1.3 Tacrina e Flurbiprofeno

O flurbiprofeno é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) com atividade de na

diminuição da formação do peptídeo β A. Essa ação se dá por meio da modulação alostérica da presenilina-1 (PS-1), uma proteína constituinte do complexo γ -secretase, responsável pelo processo de clivagem anormal do PPA (ABDUL-HAY et al., 2009).

Tendo em vista essa ação de inibição da formação dos peptídeos β A, Chen e colaboradores relataram em seu estudo a hibridação do flurbiprofeno com a tacrina utilizando como teste *in vitro* AChE e BuChE (CHEN et al., 2013). A ligação do flurbiprofeno com a tacrina ocorreu por meio de ligantes de alquilenodiamina, sendo que a inibição máxima da AChE ocorreu com tamanho de cadeia de seis carbonos (Figura 10). Os híbridos estudados apresentaram atividade mista, competindo com a ACh pelo sítio catalítico (CAS) e interagindo também com PAS (CHEN et al., 2013). Os compostos estudados também apresentaram forte inibição contra a BuChE (CHEN et al., 2013).

Figura 10 – Hibridação entre a tacrina e o flurbiprofeno



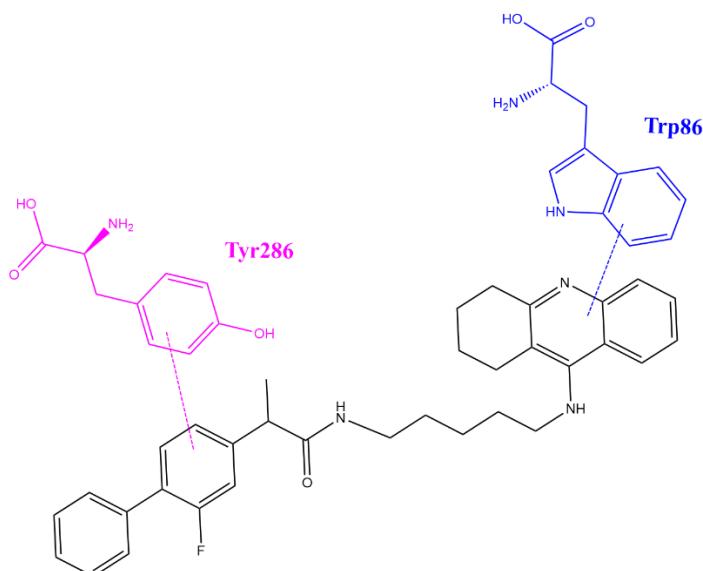
Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Para o melhor esclarecimento da interação molécula com a AChE, foi realizado um estudo de modelagem molecular utilizando o programa CDOCKER (Discovery Studio), o qual possibilitou a visualização da interação do fragmento da tacrina por empilhamento π - π paralelo com o anel indol de Trp86 (CAS) e o anel benzeno do

flurbiprofeno por interações hidrofóbicas com os resíduos de Tyr286 (PAS) (Figura 11) (CHEN et al., 2013).

Em relação ao segundo alvo deste híbrido, a análise da potência de inibição de formação de peptídeo β A foi avaliada pela técnica de ELISA (enzyme-linked immune sandwich assay) que possibilitou a identificação de redução significativa de 31% de formação da proteína β A, sendo considerado um importante candidato para o tratamento da DA (CHEN et al., 2013).

Figura 11 – Interação entre o híbrido da tacrina e flurbiprofeno com a ACh



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

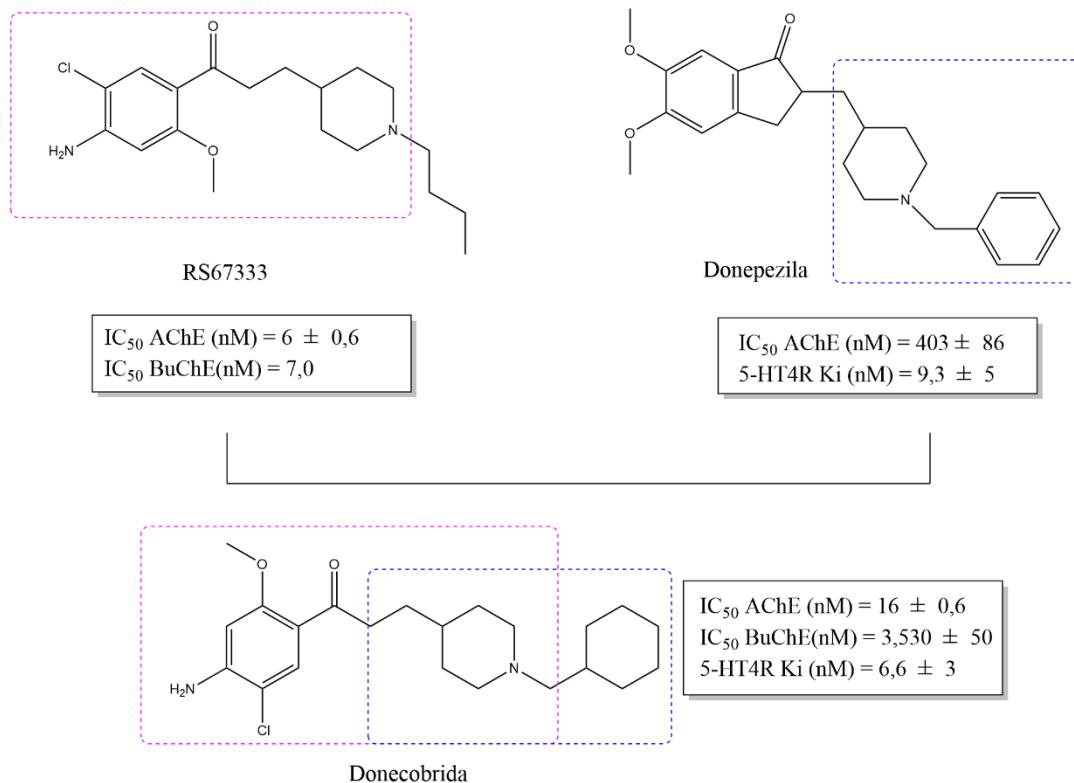
4.1.4 Donepezila e RS67333

Outra classe de fármacos estudada para a diminuição dos sintomas da DA são os agonistas dos receptores de serotonina, da família 5-HT4, os quais são amplamente expressos no SNC e estão envolvidos no recebimento de informações colinérgicas relacionadas à cognição (ROCHAIS et al., 2015). Esses receptores neuronais ligados à proteína G, quando ativados, aumentam a concentração de AMPc, levando a ativação da proteína quinase A (PKA), desencadeando toda uma cadeia de reações que leva a despolarização prolongada da membrana celular e ao aumento da liberação de ACh. Além disso, a ativação desse receptor está relacionada com a regulação da produção de

sAPPa, peptídeo não amiloidogênico gerado via processamento de APP pela α -secretase, que possui propriedades neuroprotetoras e neurotróficas (LECOUTEY et al., 2014; ROCHAIS et al., 2015).

Por essas razões, Lecoutey e seus colaboradores abordaram em seu estudo a hibridação entre RS67333, um agonista de receptores 5-HT com ação inibitória submicromolar da AChE ($IC_{50} = 403 \pm 86$ nM), com a donepezila, um inibidor da AChE e BuChE, em hibridação denominada donecobrida (Figura 12). A atividade inibitória foi realizada *in vitro* utilizando as enzimas AChE e BuChE, e o potencial de ligação aos receptores 5-HT₄ foi avaliado utilizando células de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) (LECOUTEY et al., 2014; ROCHAIS et al., 2015).

Figura 12 – Hibridação entre a donepezila e o RS67333

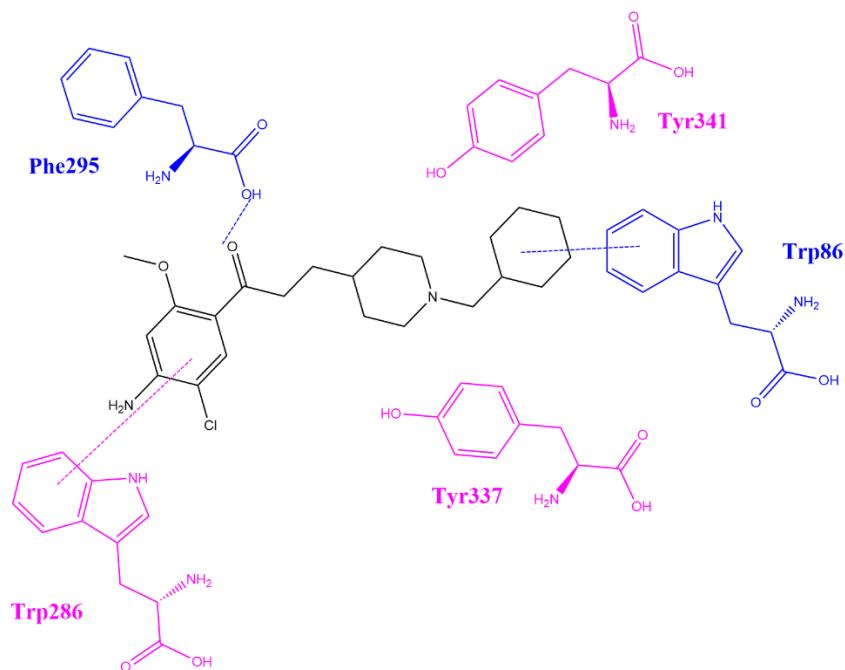


Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Nos testes *in vitro*, a donecobrida obteve resultados de inibição da AChE ($IC_{50} = 16 \pm 5$ nM) comparáveis com a donepezila ($IC_{50} = 6 \pm 0,6$ nM), além de apresentar valores de inibição da BuChE superiores ($IC_{50} = 3,5 \pm 0,05$ nM) (LECOUTEY et al., 2014). Para

uma compreensão mais detalhada da interação com a enzima, foi realizado o *docking* molecular utilizando o software GOLD (CCDC Software Ltd.). Os resultados revelaram uma orientação adequada do anel piperidina para a interação com moléculas de água próximas dos aminoácidos Tyr337 e Tyr341 (componentes do PAS), a região da carbonila estabelecendo ligações de hidrogênio com o nitrogênio do Phe295 (componente do CAS), o anel benzeno disposto de forma paralela ao anel indol do Trp286 (PAS), permitindo uma interação por empilhamento π , e o anel ciclo hexano interagindo com Trp86 (CAS) por meio de interações hidrofóbicas (Figura 13) (LECOUTEY et al., 2014; ROCHAIS et al., 2015).

Figura 13 – Intereração entre a Donecobrida com a ACh



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Com relação a ligação aos receptores 5-HT4, a donecoprida atuou como um agonista potente, seletivo e parcial com resultados melhores do que o próprio RS67333 ($K_i = 6,6 \pm 3$ nM e $K_i = 9,3 \pm 5$ nM, respectivamente), afinidade que está ligada principalmente com a presença do nitrogênio da piperidina e o grupo metilcicloalquil. Por fim, o estudo ainda avaliou a capacidade de secreção de sAPP α *in vitro* utilizando células COS-7 que estavam expressando transitoriamente o receptor 5-HT4. Os resultados da

donecoprida ($EC_{50} = 11,3 \pm 10,0$ nM) mostraram-se melhores do que comparado com a serotonina ($EC_{50} = 39,9 \pm 3,3$ nM) e o RS67333 ($EC_{50} = 27,2 \pm 10,6$ nM), indicando maior liberação de sAPP α em menores concentrações e consequentemente maior propriedade neuroprotetora (LECOUTEY et al., 2014).

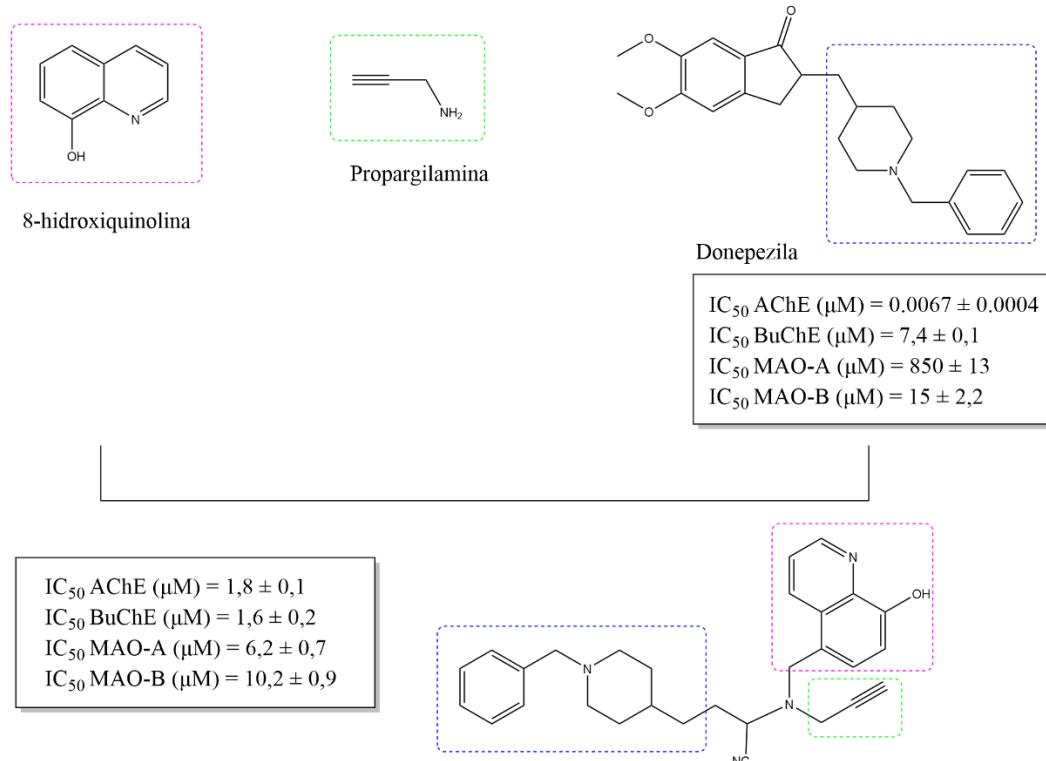
4.1.5 8-Hidroxiquinolina, donepezila e propargilamina

Uma outra estratégia de hibridação aborda o uso de moléculas quelantes e antioxidantes no tratamento da DA, isso devido a importância do estresse oxidativo na patogenicidade da doença. A presença de biometais no SNC (como cobre, ferro e zinco), em níveis muito baixos, é necessária para atuar como cofatores de atividades enzimáticas e garantir a função mitocondrial e neuronal (LIU et al., 2019). Entretanto, o aumento da concentração desses metais está relacionado com a elevação da agregação e toxicidade da proteína β amilóide e com a elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem provocar alterações no próprio peptídeo β A, como também causar a oxidação de lipídios e proteínas da membrana celular (KHAN; BARVE; KUMAR, 2020; LIU et al., 2019).

Nesse contexto, Wang e colaboradores exploraram a hibridação da donepezila com a 8-hidroxiquinolina, que possui função quelante de metais. Para unir essas duas regiões, foi inserido, ainda, um grupo propargilamina (Figura 14), com o objetivo de potencializar a inibição nas isoenzimas MAOs (do inglês, monoamine oxidase (WANG et al., 2014).

Diversos estudos abordam a hibridação com estruturas que inibam as MAOs, as quais possuem duas isoformas: a MAO-A, responsável preferencialmente pela desaminação de serotonina, adrenalina e noradrenalina, e a MAO-B, que atua preferencialmente na dopamina (WANG et al., 2014). Essas isoenzimas são alvos importantes para o tratamento da DA devido a sua ação oxidativa de uma variedade de aminas biogênicas e xenobióticas, com produção de peróxido de hidrogênio, um intermediário chave na produção de radicais livres oxigenados relacionados com o agravamento da doença (WANG et al., 2014).

Figura 14 – Hibridação da donepezila com 8-hidroxiquinolina

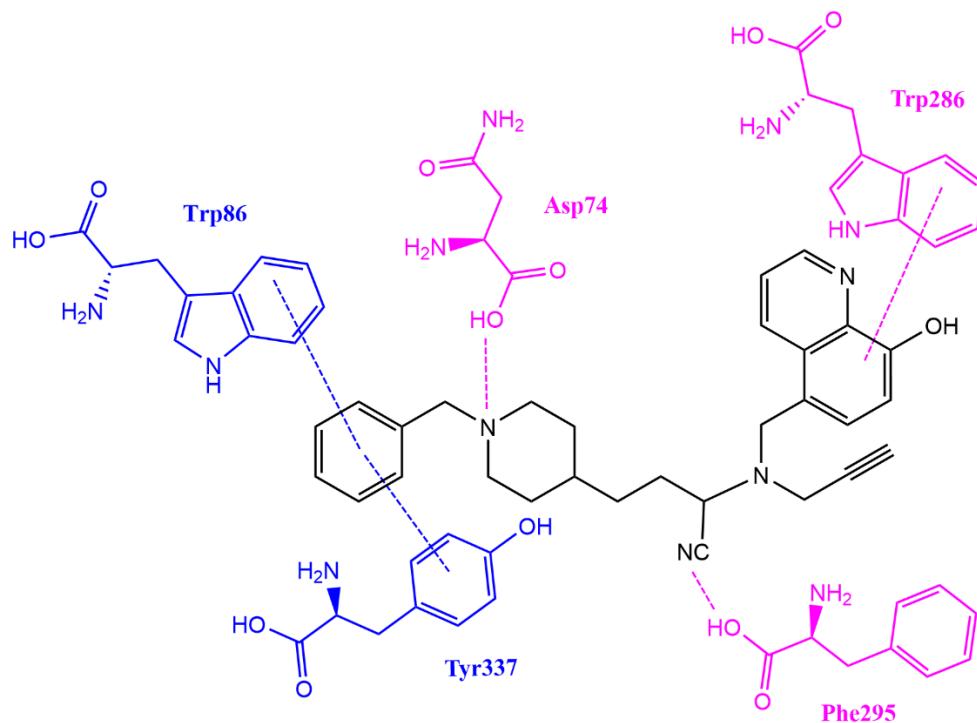


Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

No presente estudo, a atividade inibitória foi verificada utilizando AChE e BuChE, obtendo-se a inibição da AChE com $IC_{50} = 1,8 \pm 0,1 \mu M$, valor menor e comparável com o da donepezila ($IC_{50} = 0,0067 \pm 0,0004 \mu M$), entretanto apresentou maior atividade inibitória sobre a BuChE ($IC_{50} = 1,6 \pm 0,2 \mu M$ e $7,4 \pm 0,1 \mu M$, respectivamente) (WANG et al., 2014; WU et al., 2016).

Para a melhor compreensão da interação da molécula e AChE foi realizado um ensaio de docking molecular utilizando o software Autodock Vina. O docking possibilitou a visualização de interações de empilhamento π entre a 8-hidroxiquinolina do híbrido com o Trp286 (PAS) e o grupo benzeno com Trp86 e Tyr337 (CAS), a molécula ainda estabeleceu ligações de hidrogênio pelo grupo nitrila com o aminoácido Phe295 (PAS) e a porção piperidina com o Asp74 (PAS) (Figura 15) (WANG et al., 2014).

Figura 15 – Interação entre o híbrido de donepezila e 8-hidroxiquinolina com a AChE



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Com relação as propriedades inibidoras das MAOs, foram utilizados homogenatos de fígado de rato para demonstrar o aumento da inibição para as duas isoformas da enzima ($IC_{50} = 6,2 \pm 0,7 \mu M$ para MAO-A e $IC_{50} = 10,2 \pm 0,9 \mu M$ para MAO-B) se comparadas com os valores da donepezila ($IC_{50} = 850 \pm 013 \mu M$ para MAO-A e $IC_{50} = 115 \pm 2,2 \mu M$ para MAO-B). O estudo ainda aborda a questão a hepatotoxicidade causada pelo híbrido, demonstrando que a molécula é menos tóxica que a donepezila em altas e baixas concentrações (WANG et al., 2014).

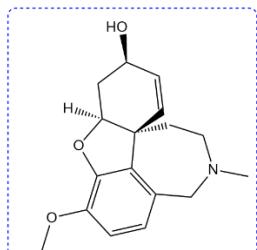
Finalmente, as propriedades quelantes do composto estudado foram analisadas por meio de espectrometria UV e VIS para os biometais Cu(II), Fe(II) e Zn(II). O uso da molécula híbrida exibiu alterações espectrais demonstrando a formação de complexos com íons Zn^{2+} e Cu^{2+} e capacidade de absorção de ROS que estão relacionados com o estresse oxidativo celular e a alteração do peptídeo β A presentes em pacientes com DA (WANG et al., 2014).

4.1.6 Galantamina e memantina

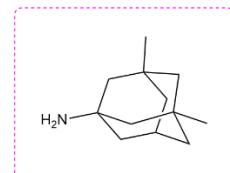
A memantina foi o primeiro antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA a ser aprovado pelo FDA. A eficácia exata dessa molécula ainda não é completamente compreendida, mas sabe-se que, por agir de forma não competitiva, possuir afinidade moderada pelo canal aberto, ser fortemente dependente de voltagem e apresentar rápida cinética de bloqueio e desbloqueio, o composto possui um perfil mais bem tolerado, com menos efeitos colaterais se comparado a outros antagonistas de NMDA. Estudos sugerem que a memantina bloqueie o receptor quando o canal está aberto, ou seja, quando há excesso de glutamato no meio, não atuando em situações em que o neurotransmissor não esteja presente. Desta forma, o bloqueio desses receptores impede o influxo excessivo de cálcio e a excitotoxicidade que culminaria na formação de radicais livres que são danosos às células neuronais (MAROTTA et al., 2020; SIMONI et al., 2012).

Neste contexto, Simoni e colaboradores propuseram a síntese do memagal, resultado da hibridação entre a galantamina, um inibidor de AChE, com a memantina (Figura 16) unidos por um espaçante de cadeia alquílica com seis carbonos. No presente estudo, a atividade inibitória sobre a AChE resultou em uma maior inibição da enzima ($IC_{50} = 1,16 \pm 0,03$ nM) se comparada com a galantamina ($IC_{50} = 2550 \pm 690$ nM) (MAROTTA et al., 2020; SIMONI et al., 2012).

Figura 16 – Hibridação da galantamina e memantina



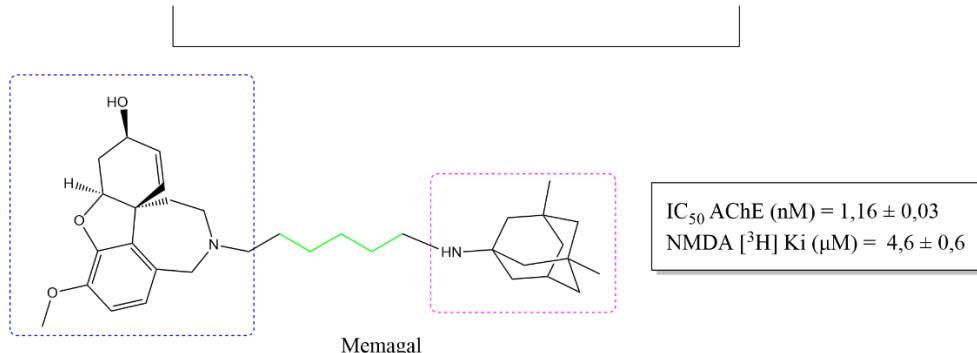
Galantamina



Memantina

IC_{50} AChE (nM) = 2550 ± 690

NMDA [³H] Ki (μM) = 1,16 ± 0,07



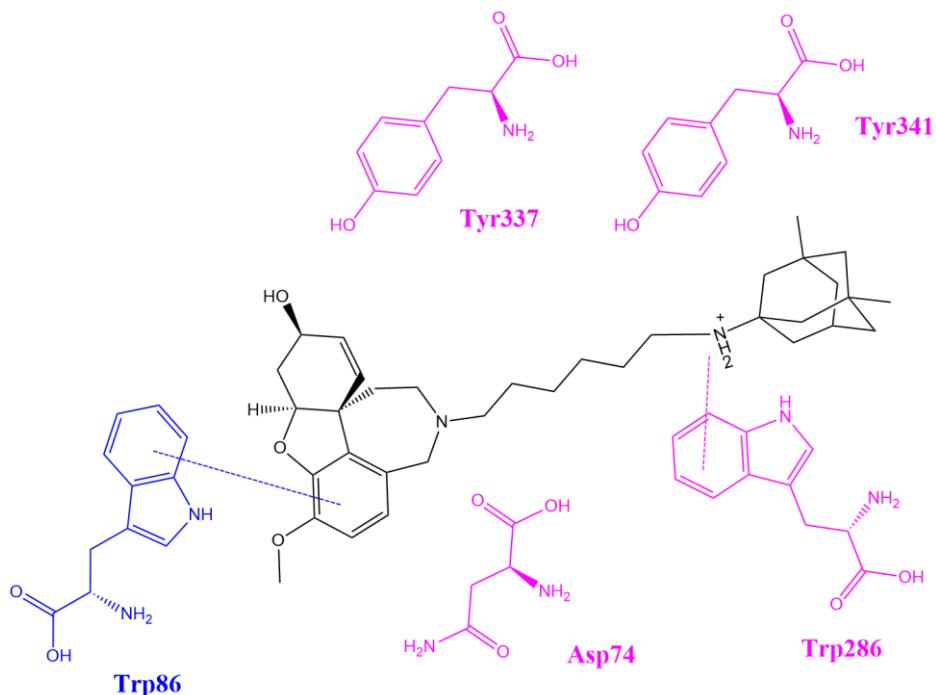
IC_{50} AChE (nM) = 1,16 ± 0,03
NMDA [³H] Ki (μM) = 4,6 ± 0,6

Memagal

Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Para o melhor entendimento das interações com a enzima, foram realizadas simulações de docking molecular que possibilitaram a visualização da galantamina estabelecendo interação hidrofóbica com anel indol do Trp86 (CAS), dispondo o ligante em uma cavidade estreita composta pelos aminoácidos Asp74, Tyr337e Tyr341 (PAS). Ainda, ocorre interações do tipo cátion-π entre a amina protonada da memantina com o grupo indol do Trp286 (PAS) (Figura 17) (SIMONI et al., 2012).

Figura 17 – Interação 2D do memagal com a AChE



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Por fim, o antagonismo do memagal aos receptores de NMDA foi verificado pela utilização de linhagens celulares de neuroblastoma SHSY-5Y, que apresentou resultados semelhantes ao da memantina ($K_i = 4.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$ e $K_i = 1.16 \pm 0.07 \mu\text{M}$, respectivamente). Isso permite estabelecer um perfil neuroprotetor pela supressão da neurotoxicidade causada pelo glutamato, para que seja possível prolongar os efeitos dos IAChe na melhora dos sintomas da doença (SIMONI et al., 2012).

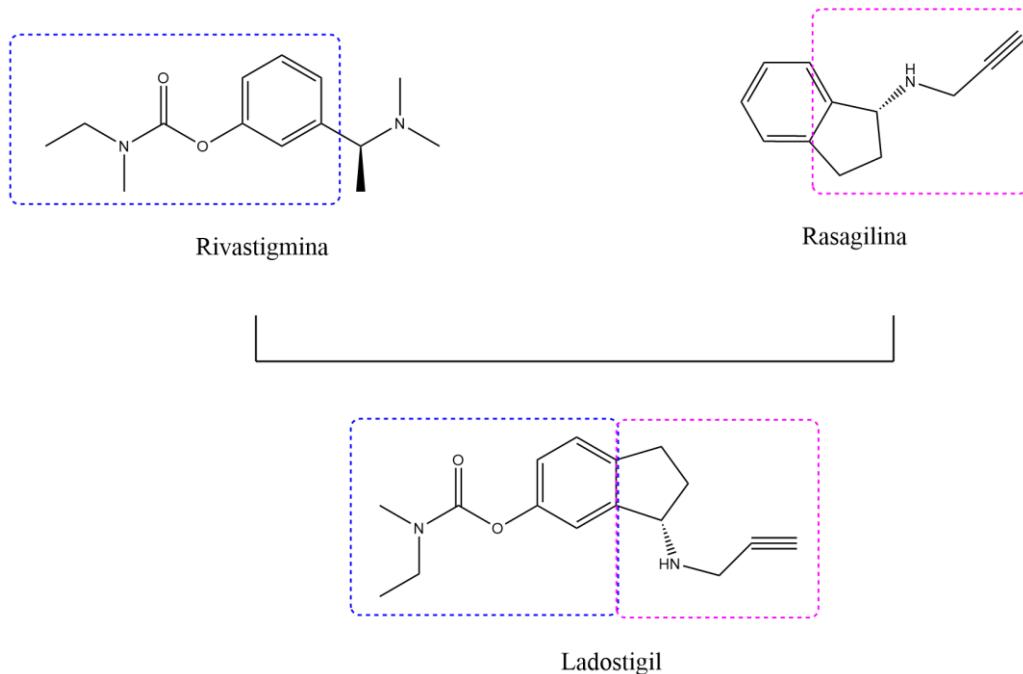
4.1.7 Rivastigmina e rasagilina

A rasagilina é um inibidor irreversível seletivo da MAO-B e tem seu uso como monoterapia para o tratamento da doença de Parkinson, essa classe de fármacos é estudada para DA devido a ação oxidativa da enzima de aminas biogênicas que favorecem a formação de radicais livres (WANG et al., 2014). Ao contrário de outros inibidores de MAO, como a selegilina, a rasagilina molécula não é metabolizada em compostos tóxicos semelhantes às anfetaminas, o que resulta na diminuição dos efeitos

indesejados que são atribuídos a essa classe (WEINSTOCK; GOREN; YOUDIM, 2000). Ainda, por ser uma molécula seletiva à MAO-B e apresentar inibição mínima da MAO-A no trato intestinal e fígado, há uma menor interação medicamentosa com alimentos que contenham tiramina. As MAO-A e MAO-B são enzimas responsáveis pela inativação de aminas dietéticas presentes em alimentos como queijos e derivados de origem animal, facilitando a adesão à terapia (WEINSTOCK et al., 2000; WEINSTOCK; GOREN; YOUDIM, 2000).

O estudo de Weinstock e colaboradores aborda a junção do grupo carbamato da rivastigmina (inibidor da AChE e BuChE) com a porção indolamina presente na rasagilina, híbrido que posteriormente foi denominado de ladostigil (Figura 18). A atividade inibitória da AChE e BuChE foi interessante, com inibições de início relativamente lento, apresentando IC_{50} (AChE) = 51 μ M e IC_{50} (BuChE) = 1,7 μ M. Com relação à inibição da MAO-B, a introdução da porção carbamato da rivatigmina resultou em um mecanismo de ação extra, que possivelmente envolve a ligação ao gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enzima crítica na prevenção da apoptose celular (DENYA et al., 2018; WEINSTOCK et al., 2000b; WEINSTOCK; GOREN; YOUDIM, 2000).

Figura 18 – Hibridação da rivastigmina com rasagilina formando o ladostigil



Fonte: elaborado pela autora em ChemDraw® (2023)

Atualmente, o ladostigil encontra-se em ensaios clínicos de fase II, com estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. A última publicação, em 2019, abordou o uso do ladostigil em baixa dose (10 mg/dia), resultando em redução da diminuição do volume cerebral e do hipocampo, bem como na progressão da doença, em comparação com o placebo. No entanto, os resultados esperados ainda não foram alcançados devido à falta de melhora na cognição dos pacientes. Neste contexto, o estudo está explorando o uso do ladostigil em alta dose (80 mg/dia) como uma tentativa de avançar nos resultados obtidos (SCHNEIDER et al., 2019).

5. CONCLUSÃO

Com o rápido envelhecimento da população mundial, doenças neurodegenerativas como a DA tornam-se cada vez mais prevalentes na sociedade. Por se tratar de uma doença multifatorial, o planejamento de novos fármacos é fundamental para buscar novas alternativas terapêuticas que reduzam a progressão da doença. Portanto, uma nova abordagem de fármacos que atuem em dois ou mais alvos biológicos vem crescendo nos últimos anos.

No presente trabalho, foram exploradas sete hibridações moleculares, focando na combinação dos inibidores da acetilcolinesterase (AChE) com antioxidantes, antagonistas de receptores NMDA, AINEs, agonistas de receptores 5-HT4, quelantes, inibidores do peptídeo β A e inibidores da MAO. Todas essas combinações demonstraram resultados promissores *in vitro*. Destacam-se especialmente as hibridações da tacrina com o ebselen e o memagal, que apresentaram as maiores taxas de inibição da AChE e BuAChE. Além disso, a hibridação envolvendo 8-hidroxiquinolina, donepezila e propargilamina, apesar de não ter apresentado uma inibição elevada da enzima, demonstrou ação em três outros processos biológicos, o que pode torná-la um candidato promissor para estudos *in vivo*.

Apesar dos resultados promissores até agora, as moléculas discutidas encontram-se em estágios muito iniciais de pesquisa, exigindo mais estudos e atenção para seu desenvolvimento. É crucial investigar questões de toxicidade associadas a antagonistas de NMDA e inibidores de MAOs, analisando cuidadosamente o equilíbrio entre risco e benefício. Um exemplo é o ladostigil, atualmente em fases clínicas avançadas. Embora o estudo tenha levantado perguntas sobre a eficácia do medicamento para melhorar a cognição do paciente, especialmente em doses mais altas, os resultados desses ensaios ainda não estão disponíveis. Contudo, é esperado que questões relacionadas à toxicidade surjam durante essas investigações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAY, S. O. et al. NO-flurbiprofen reduces amyloid- β , is neuroprotective in cell culture, and enhances cognition in response to cholinergic blockade. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 3, p. 766–776, nov. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06353.x>

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's Disease Facts and Figures. p. 1–122, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/alz.12638>

BARTOLUCCI, C. et al. Three-dimensional Structure of a Complex of Galanthamine (Nivalin) with Acetylcholinesterase From Torpedo californica: Implications for the Design of New Anti-Alzheimer Drugs. **Wiley-Liss, INC**, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010201\)42:2%3C182::aid-prot50%3E3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010201)42:2%3C182::aid-prot50%3E3.0.co;2-1)

BOLEA, I. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of donepezil and N-[(5-(Benzylxy)-1-methyl-1H-indol-2-yl)methyl]-N-methylprop-2-yn-1-amine hybrids as new multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 24, p. 8251–8270, 22 dez. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm200853t>

BOLOGNESI, M. L. Polypharmacology in a single drug: multitarget drugs. **Bentham Science Publishers**, v. 20, p. 1639–1654, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867311320130004>

CALDERON-GARCIDUEÑAS, A. L.; DUYCKAERTS, C. Alzheimer disease. Em: **Handbook of Clinical Neurology**, v. 145p. 325–337, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802395-2.00023-7>

CHALUPOVA, K. et al. Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal**

Chemistry, v. 168, p. 491–514, 15 abr. 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.021>

CHEN, Y. et al. Tacrine-flurbiprofen hybrids as multifunctional drug candidates for the treatment of alzheimer's disease. **Archiv der Pharmazie**, v. 346, n. 12, p. 865–871, dez. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ardp.201300074>

CHU, L. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. **Hong Kong Med J**, v. 18, n. 3, p. 228–237, 2012. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22665688/>

CREWS, L.; MASLIAH, E.; MASLIAH, E. Molecular Mechanisms of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. **Oxford University Press**, v. 15, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>

DAS, N.; RAYMICK, J.; SARKAR, S. Role of metals in Alzheimer's disease. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, p. 1627-1639, 1 out. 2021. Disponível em:
<https://doi.org/10.1007/s11011-021-00765-w>

DELANOGARE, E. et al. Hipótese amiloide e o tratamento da doença de Alzheimer: revisão dos estudos clínicos realizados. **Vittalle**, n. 1, p. 84–106, 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.14295/vittalle.v31i1.8395>

DENYA, I. et al. Design, synthesis and evaluation of indole derivatives as multifunctional agents against Alzheimer's disease. **MedChemComm**, v. 9, n. 2, p. 357–370, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039%2Fc7md00569e>

ESTEBAN, G. et al. Kinetic and structural analysis of the irreversible inhibition of human monoamine oxidases by ASS234, a multi-target compound designed for use in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 6, p. 1104–1110, 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.03.006>

FROST, B.; JACKS, R. L.; DIAMOND, M. I. Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 19, p. 12845–12852, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.m808759200>

GREIG, N. H.; LAHIRI, D. K.; SAMBAMURTI, K. Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. **International Psychogeriatrics**, v. 14, n. SUPPL. 1, p. 77–91, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s1041610203008676>

HARMAN, D. A Hypothesis on the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 152–168, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb39059.x>

HROCH, L. et al. Benzothiazoles - Scaffold of Interest for CNS Targeted Drug. **Current Medicinal Chemistry**, p. 730-747, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867322666141212120631>

HROUDOVÁ, J. et al. Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 774-784, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.084>

JU, Y.; TAM, K. Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 17, p. 543-549, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320970>

KERI, R. S. et al. Design, synthesis and neuroprotective evaluation of novel tacrine-benzothiazole hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 15, p. 4559–4569, 2013. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.028>

KHAN, S.; BARVE, K. H.; KUMAR, M. S. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 18, n. 11, p. 1106–1125, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200528142429>

LECOUTEY, C. et al. Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 36, p. E3825–E3830, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1410315111>

LI, Q. et al. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 422-487, 2018. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.031>

LIPTON, S. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 6, p. 61–74, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/jad-2004-6s610>

LIPTON, S.; ROSENBERG, P. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 9, p. 613–621, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejm199403033300907>

LIU, P. P. et al. History and progress of hypotheses and clinical trials for alzheimer's disease. **Nature**, v. 4, n. 1, 2019. Disponivel em: <https://doi.org/10.1038%2Fs41392-019-0063-8>

MAKHOBA, X. H. et al. Potential impact of the multi-target drug approach in the

treatment of some complex diseases. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 3235–3249, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/dddt.s257494>

MAO, F. et al. Novel tacrine-ebselen hybrids with improved cholinesterase inhibitory, hydrogen peroxide and peroxynitrite scavenging activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 24, p. 6737–6742, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.034>

MAROTTA, G. et al. Memantine Derivatives as Multitarget Agents in Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 25, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules25174005>

MINISTÉRIO DA SAÚDE, A. N. DE V. S. (ANVISA). Portaria Conjunta N°13, de 28 de novembro de 2017. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Alzheimer.**, 2017. Disponível em: www.saude.gov.br/sas, Acesso: 20/01/2023.

NEPALI, K. et al. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 422-487, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.018>

NICHOLS, E. et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Public Health**, v. 7, n. 2, p. e105–e125, 2022. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/s2468-2667(21)00249-8)

POURSHOJAEI, Y. et al. Phenoxyethyl Piperidine/Morpholine Derivatives as PAS and CAS Inhibitors of Cholinesterases: Insights for Future Drug Design. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-56463-2>

PRVULOVIC, D.; HAMPEL, H.; PANTEL, J. Galantamine for Alzheimer's disease. Expert Opinion on Drug. **Metabolism and Toxicology**, v. 6, p. 345-354, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17425251003592137>

RAJAN, K. B. et al. Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020–2060). **Alzheimer's and Dementia**, v. 17, n. 12, p. 1966–1975, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002%2Falz.12362>

RAJESHWARI, R. et al. New multitarget hybrids bearing tacrine and phenylbenzothiazole motifs as potential drug candidates for Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 24, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24030587>

RAMSAY, R. R. et al. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0181-2>

ROCHAIS, C. et al. Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT4R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3172–3187, 9 abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00115>

ROGAWSKI, M. A.; WENK, G. L. The Neuropharmacological Basis for the Use of Memantine in the Treatment of Alzheimer's Disease. **CNS Drug Reviews**, v. 9, n. 3, p. 275–308, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2003.tb00254.x>

SCAZUFCA, M. et al. Investigações epidemiológicas sobre demência nos países em desenvolvimento Epidemiological research on dementia in developing countries. **Rev Saúde Pública**, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034->

89102002000700018

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 555–563, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>

SCHNEIDER, L. S. et al. Low-dose ladostigil for mild cognitive impairment: A phase 2 placebo-controlled clinical trial. **Neurology**, v. 93, n. 15, p. e1474–e1484, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000008239>

SIMONI, E. et al. Combining galantamine and memantine in multitargeted, new chemical entities potentially useful in Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 9708–9721, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm3009458>

SMITH, M. A. Alzheimer disease. **International Review of Neurobiology**, v. 42, p. 1–54, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0074-7742\(08\)60607-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7742(08)60607-8)

TANOLI, S. T. et al. Design, synthesis and bioevaluation of tricyclic fused ring system as dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 83, p. 336–347, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.035>

TOUCHON, J. et al. Response to rivastigmine or donepezil in Alzheimer's patients with symptoms suggestive of concomitant Lewy body pathology. **Librapharm Limited**, v. 22, p. 49–59, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1185/030079906x80279>

TUMIATTI, V. et al. Tacrine Derivatives and Alzheimer's Disease. **Current Medicinal Chemistry**, p. 1825-1838, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/09298671079111206>

UDDIN, M. S. et al. Multi-Target Drug Candidates for Multifactorial Alzheimer's

Disease: AChE and NMDAR as Molecular Targets. **Molecular Neurobiology**, v. 58, p. 281-303, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02116-9>

UNZETA, M. et al. Multi-target directed donepezil-like ligands for Alzheimer's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00205>

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. NeuroAD therapy system for the treatment of mild to moderate Alzheimer's disease Neuronix Ltd. **U.S. Food and drug administration**, 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/122841/download>. Acesso: 24/01/2023

VAZ, M.; SILVESTRE, S. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. **European Journal of Pharmacology**, v. 887, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>

WANG, L. et al. Donepezil + propargylamine + 8-hydroxyquinoline hybrids as new multifunctional metal-chelators, ChE and MAO inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 543–561. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.078>

WEINREB, O. et al. A novel anti-Alzheimer's disease drug, ladostigil. neuroprotective, multimodal brain-selective monoamine oxidase and cholinesterase inhibitor. **International Review of Neurobiology**, v. 100p. 191–215, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386467-3.00010-8>

WEINREB, O. et al. Ladostigil: A Novel Multimodal Neuroprotective Drug with Cholinesterase and Brain-Selective Monoamine Oxidase Inhibitory Activities for Alzheimer's Disease. **TreatmentCurrent Drug Targets**, p. 483-494, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138945012799499794>

WEINSTOCK, M. et al. TV3326, a novel neuroprotective drug with cholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activities for the treatment of Alzheimer's disease. **Neurology**, p. 1–13, 2000. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6301-6_10

WEINSTOCK, M. et al. Neuroprotective Effects of Novel Cholinesterase Inhibitors Derived from Rasagiline as Potential Anti-Alzheimer Drugs. **Neurology**, p. 1–14, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03622.x>

WEINSTOCK, M.; GOREN, T.; YOUDIM, M. B. H. Development of a Novel Neuroprotective Drug (TV3326) for the Treatment of Alzheimer's Disease, With Cholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibitory Activities. **Neurology**, p. 1–7, 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1002/1098-2299\(200007/08\)50:3/4%3C216::AID-DDR4%3E3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/1098-2299(200007/08)50:3/4%3C216::AID-DDR4%3E3.0.CO;2-Z)

WU, M. Y. et al. Donepezil-like multifunctional agents: Design, synthesis, molecular modeling and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 864–879, 2016. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.001>

WU, W. Y. et al. Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of alzheimer's disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 572-587, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080%2F14756366.2016.1210139>

27/11/2023 Kornile Hiromi Gavon

Data e assinatura do aluno(a)

27/11/2023

Roberdo Braga Filho

Data e assinatura do orientador(a)