



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

THAÍS MEIRA MENEZES

**POTENCIAL REPOSICIONAMENTO DE INIBIDORES DA TIROSINA
QUINASE NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER E EFEITOS NO
BIOTRANSORTE ASSOCIADOS À GLICAÇÃO DE PROTEÍNAS**

Recife

2022

THAÍS MEIRA MENEZES

**POTENCIAL REPOSICIONAMENTO DE INIBIDORES DA TIROSINA QUINASE
NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER E EFEITOS NO
BIOTRANSORTE ASSOCIADOS À GLICAÇÃO DE PROTEÍNAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Química.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Neves.

Recife

2022

Catálogo na fonte
Bibliotecária Monick Raquel Silvestre da S. Portes, CRB4-1217

M543p Menezes, Thaís Meira
Potencial reposicionamento de inibidores da tirosina quinase no tratamento da doença de Alzheimer e efeitos no biotransporte associados à glicação de proteínas / Thaís Meira Menezes. – 2022.
131 f.: il., fig., tab.

Orientador: Jorge Luiz Neves.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química, Recife, 2022

Inclui referências e anexo.

1. Físico-química. 2. Inibição enzimática. 3. Glicação. I. Neves, Jorge Luiz (orientador). II. Título.

541.3 CDD (23. ed.) UFPE - CCEN 2022-165

THAÍS MEIRA MENEZES

**POTENCIAL REPOSICIONAMENTO DE INIBIDORES DA TIROSINA QUINASE
NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER E EFEITOS NO
BIOTRANSORTE ASSOCIADOS À GLICAÇÃO DE PROTEÍNAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção
do título de doutora em Química.

Aprovada em: 05/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Jorge Luiz Neves (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Adriane Regina Todeschini (Examinadora externa)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profº. Dr. Jefferson Luiz Princival (Examinador Externo)
Universidade Federal de São João Del-Rei

Profº. Dr. Fauston Fred da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

Profª. Drª. Luana Oliveira Santos (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta tese à minha família, especialmente ao meu filho, Arthur.

RESUMO

Os inibidores da tirosina quinase (ITQ) são compostos antitumorais que impedem a fosforilação de proteínas em meio biológico. Entretanto, a atuação multi-alvo dos ITQs os promovem a possíveis candidatos à realização de estudos referentes ao reposicionamento de fármacos para tratamento da Doença de Alzheimer (DA). Por este motivo, foram estudados o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelos fármacos Lapatinibe e Pazopanibe, bem como os seus modos de interação proteínas-fármaco, tanto com a AChE quanto com as proteínas plasmáticas HSA e gHSA, tendo em vista que a glicação de proteínas está altamente associada à DA. Os resultados indicaram forte inibição da AChE a nível de μM . Identificaram-se os tipos de inibição, tendo o sistema pazopanibe-AChE inibição não competitiva e a lapatinibe-AChE inibição incompetitiva. Os estudos de supressão de fluorescência da AChE indicam mecanismo estático para os dois fármacos com constante de ligação na ordem de 10^5 M^{-1} . Os parâmetros termodinâmicos obtidos revelam a presença de interações dirigidas por forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio no sistema lapatinibe-AChE. Em contraponto, o sistema pazopanibe-AChE revela a presença de interações hidrofóbicas. Estudos de fluorescência sincronizada sugerem mudanças conformacionais no microambiente dos resíduos de triptofano e tirosina da proteína em contato com a lapatinibe. Já a pazopanibe ocasiona aumento na polaridade apenas ao redor dos resíduos de triptofano, permanecendo os resíduos de tirosina inalterados. O estudo de FRET demonstra que a distância entre a Pazopanibe e o seu sítio de ligação na AChE é de 2,23 nm. Os estudos de fluorescência 3D indicam suaves alterações conformacionais na AChE ao interagir com os fármacos. Em relação às proteínas plasmáticas, Pazopanibe interage de forma estática para HSA e gHSA, enquanto Lapatinibe interage de colisionalmente com gHSA e forma um complexo com a HSA. Além disso, os dois fármacos demonstram maior força de interação com a HSA ao se comparar com sua forma glicada. A partir disso, infere-se que tais fármacos são apropriados para a realização de estudos mais aprofundados no que diz respeito ao seu reposicionamento para tratamento da DA, além da constatação da influência da glicação na biodistribuição dos mesmos.

Palavras-chave: inibidor tirosina quinase; drogas multi-alvo; inibição enzimática; supressão de fluorescência; doença de alzheimer; glicação.

ABSTRACT

Tyrosine kinase inhibitors (ITQ) are antitumor compounds which prevent the phosphorylation of proteins in a biological environment. However, the multi-target performance of ITQs makes them possible candidates for carrying out studies related to the repositioning of drugs for the treatment of Alzheimer's Disease (AD). Therefore, we studied the potential to inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE) by Lapatinib and pazopanib drugs, as well as their methods of protein-drug interactions, both AChE and with plasma proteins HSA and GHSA, considering that glycation of proteins is highly associated with AD. The results showed strong inhibition of AChE-level μM . We identified the types of inhibition, the AChE-pazopanib system uncompetitive inhibition and lapatinib-AChE acompetitive inhibition. The fluorescence quenching studies of AChE show two static mechanism for drugs with binding constant on the order of 10^5 M^{-1} . The thermodynamic parameters obtained show the presence of interactions driven by Van der Waals forces and hydrogen bonds in the AChE-lapatinib system. In contrast, the system pazopanib-AChE reveals the presence of hydrophobic interactions. synchronous fluorescence studies suggest conformational changes in the microenvironment of tryptophan residues and tyrosine protein in contact with lapatinib. Already pazopanib causes increase in polarity just around the tryptophan residues, remaining tyrosine residues unchanged. The study shows that the FRET distance between the pazopanib and its binding site on AChE is 2.23 nm. 3D fluorescence studies indicate soft conformational changes in AChE to interact with the drug. With respect to plasma proteins, Pazopanib interacts statically for HSA and gHSA, while Lapatinib interacts in a collisional manner with gHSA and forms a complex with HSA. In addition, the two drugs show greater strength of interaction with the HSA when compared with their glycated form. From this, it is inferred that such drugs are suitable for carrying out further studies with regard to the repositioning treatment of AD, as well as verification of the influence of glycation on the biodistribution thereof.

Keywords: tyrosine kinase inhibitor; multi-targeted drugs; enzyme inhibition; fluorescence suppression; alzheimer's disease; glycation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características patológicas definidoras da doença de Alzheimer.....	18
Figura 2 -	Síntese da acetilcolina e seu mecanismo de ação interneuronal.	22
Figura 3 -	Características estruturais do sítio ativo da AChE (A). Resíduos de aminoácidos presentes na cavidade do sítio ativo da enzima AChE humana (B).	24
Figura 4 -	Drogas inibidoras da acetilcolinesterase aprovadas para tratamento da Doença de Alzheimer.	25
Figura 5 -	Processo de Glicação de proteínas, desde o estágio inicial até a formação dos AGEs.	28
Figura 6 -	Estrutura da albumina sérica humana (HSA) com a representação dos domínios, subdomínios e locais de ligação de Sudlow I e II.	30
Figura 7 -	Localização dos principais resíduos de aminoácidos envolvidos na Glicação. Resíduos de Lisina in vivo (a) e in vitro (c); Resíduos de Arginina in vivo (b) e in vitro (d).	31
Figura 8 -	Etapas envolvidas na descoberta de fármacos.	32
Figura 9 -	Estrutura química da tirosina e da fosfotirosina (A) e reação de fosforilação dos resíduos de tirosina (B).	34
Figura 10 -	Representação do mecanismo de ação celular dos inibidores da tirosina quinase.	35
Figura 11 -	Gráfico da velocidade contra a concentração de substrato de acordo com a equação de Michaelis-Menten (A). Gráfico de Lineweaver-Burk, relacionando $1/v$ com $1/[S]$ (B).	37
Figura 12 -	Gráfico de Lineweaver-Burk para a inibição competitiva (A), Inibição acompetitiva (B), Inibição não-competitiva (C) e inibição mista (D).....	40

Figura 13 -	Diagrama de gráficos de Stern-Volmer com padrão linear (verde), com desvio positivo (azul) e com desvio negativo (laranja) e as possíveis causas dos efeitos observados.....	43
Figura 14 -	Variação dos parâmetros termodinâmicos com relação às variadas interações entre biomacromoléculas.....	47
Figura 15 -	Espectros de fluorescência tridimensional e mapas de contorno da albumina sérica bovina medidos a 298 K e [BSA]= 1.5 µM.	50
Figura 16 -	Representação dos níveis de energia de orbitais moleculares e suas respectivas transições eletrônicas	51
Figura 17 -	Espectros de absorção na região UV-Vis dos resíduos de aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina e suas estruturas químicas.	52
Figura 18 -	Representação do processo de transferência de energia de ressonância de Förster entre um doador (D) e um aceptor (A).....	53
Figura 19 -	Estrutura química dos fármacos Pazopanibe (A) e Lapatinibe (B).	57
Figura 20 -	Reações de identificação da hidrólise da acetilcolina pela AChE através do DTNB (método de Ellman).....	64
Figura 21 -	Curva de Inibição da Acetilcolinesterase através do contato da enzima com o fármaco Lapatinibe (A) e Pazopanibe (B).	65
Figura 22 -	Valores de IC ₅₀ relativos à inibição da acetilcolinesterase extraídos das espécies <i>L. vannamei</i> , <i>C. rhizophorae</i> e <i>E. electricus</i> pelos fármacos lapatinibe (em azul) e pazopanibe (em vermelho).	66
Figura 23 -	Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de inibição da Acetilcolinesterase pelo fármaco Lapatinibe.	67
Figura 24 -	Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de inibição da Acetilcolinesterase pelo fármaco Pazopanibe.	68
Figura 25 -	Espectros de emissão de fluorescência da AChE e sua supressão pela adição da Lapatinibe a 296 K (A), 306 K (B)	

	e 316 K (C), com $\lambda_{exc} = 280$ nm. Solução de AChE em Tris-HCl 0,5 mM, pH 8.	69
Figura 26 -	Espectro de emissão de fluorescência da AChE e sua supressão pela adição da Pazopanibe a 296 K (A), 306 K (B) e 316 K (C). Solução de AChE em Tris-HCl 0,5 M, pH 8.	70
Figura 27 -	Gráfico de Stern-Volmer das interações entre o fármaco Lapatinibe e a enzima Acetilcolinesterase (A) e interações entre o fármaco Pazopanibe e a AChE (B).	71
Figura 28 -	Gráfico de duplo logarítmico das interações entre o fármaco Lapatinibe e a enzima Acetilcolinesterase (A) e do fármaco Pazopanibe e a enzima Acetilcolinesterase (B).....	73
Figura 29 -	Relação ΔG° vs. Temperatura para a interação Lapatinibe-Acetilcolinesterase (A) e para a interação Pazopanibe-Acetilcolinesterase (B).....	75
Figura 30 -	Espectro de fluorescência sincronizada do sistema Lapatinibe-AChE $\Delta\lambda = 15$ nm onde $\lambda_{emmax} = 362$ nm $\rightarrow$ 373 nm (A). Espectro de fluorescência sincronizada do sistema Lapatinibe-AChE $\Delta\lambda = 60$ nm onde $\lambda_{emmax} = 287$ nm $\rightarrow$ 292 nm (B).....	76
Figura 31 -	Espectro de fluorescência sincronizada do sistema Pazopanibe-AChE $\Delta\lambda = 15$ nm onde $\lambda_{emmax} = 297$ nm $\rightarrow$ 298 nm (A). Espectro de fluorescência sincronizada do sistema Pazopanibe-AChE $\Delta\lambda = 60$ nm onde $\lambda_{emmax} = 292$ nm $\rightarrow$ 297 nm (B).....	77
Figura 32 -	Espectros de fluorescência 3D (A) e mapa de contorno (B) da AChE.	78
Figura 33 -	Espectros de fluorescência 3D (A) e mapa de contorno (B) das interações Lapatinibe-AChE.	79
Figura 34 -	Espectros de fluorescência 3D (A) e mapa de contorno (B) das interações Pazopanibe-AChE.....	80

Figura 35 -	Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da AChE (linha preta) e absorção da Pazopanibe (linha rosa) a 298 K. [AChE] = [Pazopanibe] = 1,19 nmol.L ⁻¹	81
Figura 36 -	Melhor posição de ancoragem de ATC (verde) encaixada em AChE, usada como estrutura inicial para dinâmica molecular.....	82
Figura 37 -	Melhores posições para as moléculas ancoradas no sistema AChE-ATC. ATC está representada na cor laranja..	83
Figura 38 -	Distribuição das pontuações de docking de Vina para cada droga em cada suposto sítio de ligação em AChE-ATC, considerando apenas as posições dentro de 2,5 kcal/mol da posição de melhor pontuação em cada local. Os números acima das barras indicam o número de posições dentro da faixa de energia. Os pontos azuis indicam a média de Boltzmann das energias, e o ponto vermelho indica a posição com melhor classificação.	84
Figura 39 -	Melhores posições obtidas para lapatinibe e pazopanibe ancorados no sítio 1 de AChE na presença de ATC.	85
Figura 40 -	Melhores posições obtidas para Lapatinibe e Pazopanibe ancorados em AChE-ATC no sítio 2.....	86
Figura 41 -	Distribuição das pontuações de ancoragem para cada droga nos sítios de ligação 1 e 2 na presença (azul) ou ausência (laranja) de ATC.....	87
Figura 42 -	Melhores posições obtidas para Lapatinibe (Pontuação Vina -10,8) e Pazopanibe (Pontuação Vina -11,1) ancorados no Sítio 1 na ausência de ATC.....	88
Figura 43 -	Intensidade de fluorescência vs. Concentração de Pazopanibe adicionado em HSA (A) e gHSA (B) a 296 K, pH 7.4.....	94
Figura 44 -	Intensidade de fluorescência vs. Concentração de Lapatinibe adicionado em HSA (A) e gHSA (B) a 296 K, pH 7.4.	95

Figura 45 -	Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da HSA (A) e gHSA (B) causada por pazopanibe a 296 K, 303 K e 310 K.....	96
Figura 46 -	Gráfico duplo logaritmo das interações HSA-Pazopanibe (A) e gHSA-Pazopanibe (B) a 296 K, 303 K e 310 K, pH 7,4.....	98
Figura 47 -	Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da HSA (A) e gHSA (B) causada por lapatinibe a 296, 303 e 310 K, pH=7.4.	99
Figura 48 -	Gráfico duplo logaritmo das interações HSA-Lapatinibe a 296 K e 303 K, pH 7,4.	100
Figura 49 -	Gráfico de ΔG° vs. Temperatura das interações HSA-PAZO (A) e gHSA-PAZO (B), pH 7,4.	101
Figura 50 -	Gráfico de van't Hoff das interações HSA-Lapatinibe, pH 7,4.	102
Figura 51 -	Sobreposição do espectro de emissão de fluorescência de HSA (A) e gHSA (B) com o espectro de absorção de pazopanibe a 298 K, pH 7,4. As concentrações de HSA, gHSA e pazopanibe foram fixadas em 0,3 μ M.	104
Figura 52 -	Espectros de absorção de HSA (A) e gHSA (B) com concentrações de pazopanibe entre 0,0 e 0,72 μ M a 296 K, pH 7,4.....	106
Figura 53 -	Espectros de fluorescência síncrona dos sistemas HSA-Pazopanibe com $\Delta\lambda = 15$ nm (A) HSA-Pazopanibe com $\Delta\lambda = 60$ nm (B) gHSA-Pazopanibe com $\Delta\lambda = 15$ nm (C) gHSA-Pazopanibe com $\Delta\lambda = 60$ nm (D). [HSA] = [gHSA] = 0,3 μ M; [Pazopanibe] = 0 - 0,72 μ M.	108
Figura 54 -	Gráfico das interações ligante-proteína para a ancoragem de Pazopanibe no sítio I A) HSA e C) gHSA e no sítio II para B) HSA e D) gHSA.	109
Figura 55 -	Sobreposição das estruturas de HSA (PDB id: 1AO6) e gHSA (PDB id: 4IW2) (A). Melhores posições de ancoragem (p1, p2) de Pazopanibe no sítio de ligação I para HSA (B) e gHSA (C).	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Exemplos de drogas reposicionadas aprovadas.	34
Tabela 2 -	Parâmetros de ligação e de supressão de fluorescência dos sistemas fármaco-acetilcolinesterase.	72
Tabela 3 -	Parâmetros termodinâmicos da interação fármaco-acetilcolinesterase. Mudança dos valores de Entalpia (ΔH°), Entropia (ΔS°) e Energia livre de Gibbs (ΔG°) com a variação da temperatura.	74
Tabela 4 -	Dados obtidos da fluorescência tridimensional da AChE e dos sistemas fármaco-AChE.	78
Tabela 5 -	Parâmetros de FRET obtidos a partir da interação Pazopanibe-AChE.	80
Tabela 6 -	Parâmetros de ligação entre Pazopanibe-Albumina.....	96
Tabela 7 -	Parâmetros de ligação entre Lapatinibe-Albumina	98
Tabela 8 -	Parâmetros termodinâmicos da supressão de fluorescência das interações albumina-pazopanibe.	101
Tabela 9 -	Parâmetros de ligação e termodinâmicos da supressão de fluorescência das interações albumina-lapatinibe.	103
Tabela 10 -	Parâmetros de FRET obtidos a partir das interações entre a albumina e sua forma glicada com pazopanibe	104

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1	Doença de Alzheimer	17
1.2	Acetilcolinesterase	23
1.3	Inibidores da Acetilcolinesterase	24
1.4	Produtos Finais de Glicação Avançada	27
1.5	Albumina Sérica	29
1.6	Reposicionamento de fármacos	32
1.7	Inibidores da tirosina quinase	34
1.8	Cinética Enzimática	36
1.8.1	<i>Inibição Enzimática.....</i>	38
1.9	Técnicas espectroscópicas para o estudo de interações droga- proteína	40
1.9.1	<i>Supressão de fluorescência no estado estacionário</i>	41
1.9.2	<i>Fluorescência síncrona</i>	47
1.9.3	<i>Fluorescência tridimensional</i>	48
1.9.4	<i>UV-Vis</i>	50
1.9.5	<i>Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET)...</i>	53
2	ESTUDOS DE INTERAÇÃO E INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE PELAS DROGAS LAPATINIBE E PAZOPANIBE	55
2.1	Introdução e objetivos	55
2.2	Materiais e Métodos.....	58
2.2.1	<i>Reagentes</i>	58
2.2.2	<i>Metodologia</i>	58
2.2.2.1	Obtenção dos extratos de acetilcolinesterase.....	58

2.2.2.2	Ensaio de inibição da acetilcolinesterase	59
2.2.2.3	Estudo do tipo de inibição entre os fármacos e a AChE	60
2.2.2.4	Medidas de fluorescência no estado estacionário	60
2.2.2.5	Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET)	60
2.2.2.6	Estudo de fluorescência tridimensional.....	61
2.2.2.7	Estudo de fluorescência síncrona	61
2.3	Resultados e Discussão	63
2.3.1	<i>Atividade anticolinesterase dos fármacos</i>	63
2.3.2	<i>Estudo de interação fármaco-AChE por supressão de fluorescência</i>	69
2.3.3	<i>Mapeamento das alterações no microambiente dos fluoróforos da AChE</i>	75
2.3.3.1	Fluorescência síncrona.....	75
2.3.3.2	Fluorescência 3D	77
2.3.4	<i>Estudo de FRET.....</i>	80
2.3.5	<i>Análise dos sítios de ligação por estudos in silico</i>	81
3	EFEITOS DA GLICAÇÃO DA ALBUMINA SÉRICA HUMANA NA INTERAÇÃO COM OS FÁRMACOS PAZOPANIBE E LAPATINIBE.....	89
3.1	Introdução e objetivos	89
3.2	Materiais e métodos	91
3.2.1	<i>Reagentes</i>	91
3.2.2	<i>Metodologia</i>	91
3.2.2.1	Medidas de espectroscopia de fluorescência	91
3.2.2.2	Estudo de fluorescência síncrona	91
3.2.2.3	Espectros de absorção na região UV-Vis.....	92

3.2.2.4	Estudo teórico de ancoragem molecular	92
3.3	Resultados e discussão.....	93
3.3.1	<i>Analisando a supressão de fluorescência das proteínas</i>	93
3.3.2	<i>Afinidade das interações</i>	96
3.3.3	<i>Parâmetros Termodinâmicos</i>	100
3.3.4	<i>Distância entre o fluoróforo e pazopanibe</i>	103
3.3.5	<i>Espectro de absorção UV-Vis</i>	105
3.3.6	<i>Espectro de fluorescência síncrona</i>	106
3.3.7	<i>Ancoragem molecular</i>	108
4	Conclusão	109
	REFERÊNCIAS.....	113
	ANEXO A – ARTIGOS DE PRIMEIRA AUTORIA PUBLICADOS....	128

1 INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

Os eventos moleculares protagonizados por biomacromoléculas em meio fisiológico são cruciais para o bom desempenho das funções vitais de um organismo. Tais eventos atuam de forma decisiva nos processos de reconhecimento molecular entre fármacos e seus sítios de ligação endógenos, como por exemplo, proteínas alvo, neurotransmissores, hormônios, entre outros (ATTWOOD *et al.*, 2020). Especificamente, as proteínas representam uma vasta classe de alvos moleculares terapêuticos, onde dentre estas, as proteínas transportadoras, enzimas, os receptores e canais iônicos possuem maior participação em terapias alvo (LANDRY; GIES, 2008). Desta forma, o estudo *in vitro* de alvos moleculares biológicos compreende uma das importantes etapas no desenvolvimento de fármacos, tendo em vista que a formação de ligações entre o fármaco e o alvo biológico caracteriza-se como um prelúdio para a ocorrência dos efeitos farmacológicos observados *in vivo* (COPELAND; POMPLIANO; MEEK, 2006).

Em doenças de alta complexidade como problemas neurodegenerativos, os alvos moleculares pesquisados para terapia costumam ser variados, dificultando significativamente a obtenção de um fármaco que contemple o tratamento de todos os efeitos ocasionados por tais enfermidades. No caso da Doença de Alzheimer (DA), são discutidos determinados mecanismos moleculares para explicar tal desordem. As vias patogênicas e alvos moleculares mais pesquisados são a hipótese colinérgica envolvendo a enzima acetilcolinesterase (MARUCCI *et al.*, 2020), a hiperfosforilação da proteína tau (VOGEL *et al.*, 2020), a agregação da proteína beta amiloide (LEE *et al.*, 2021), o estresse oxidativo (SU *et al.*, 2008), e a hipótese inflamatória (KINNEY *et al.*, 2018).

Contudo, uma característica comum às doenças neurodegenerativas consiste na deposição anormal de proteínas com estruturas defeituosas ou agregadas (ŠIMIĆ *et al.*, 2016). A glicação de proteínas também tem sido diretamente associada à DA (KONG *et al.*, 2020), sendo esta doença considerada como uma espécie de diabetes tipo 3, devido ao fato de que alterações no

metabolismo da glicose e consequente resistência à insulina demarcam o início de todas as vias patogênicas mencionadas previamente (NGUYEN *et al.*, 2020).

Tendo em vista as inúmeras variáveis a se levar em conta nos tratamentos propostos para a doença de Alzheimer, e a emergente prática de reaproveitamento de medicamentos já aprovados para outras indicações terapêuticas, o objetivo geral da presente tese é considerar o reposicionamento de fármacos inibidores da tirosina quinase (ITQ) ao tratamento da DA, tendo em vista os objetivos específicos:

- Analisar o potencial de inibição e as interações a nível molecular de inibidores da tirosina quinase (ITQ) com a enzima acetilcolinesterase;
- Avaliar o efeito da glicação da albumina sérica humana no biotransporte dos ITQ.

1.1 Doença de Alzheimer

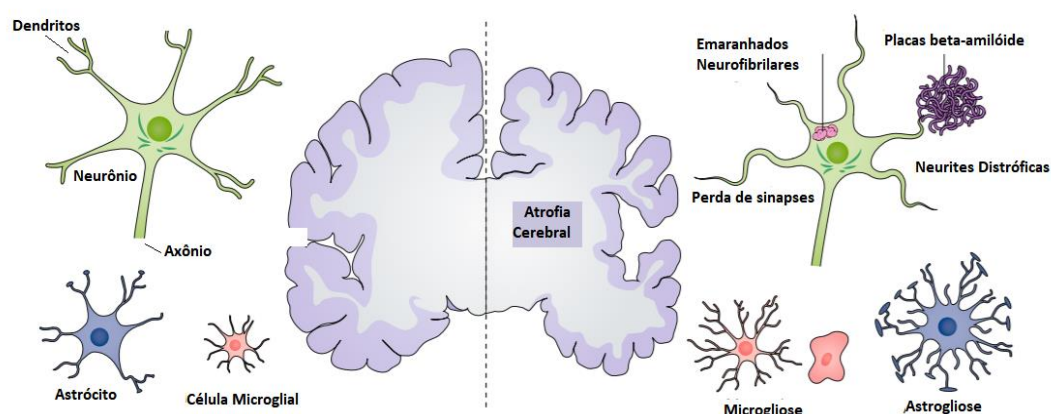
A DA é uma das doenças neurodegenerativas mais corriqueiras atualmente, existindo a possibilidade de haver mais de 100 milhões de pessoas com tal enfermidade em 2050 (BALLARD *et al.*, 2020). Esta doença é caracterizada pelo progressivo e lento declínio cognitivo, que interfere no comportamento, na capacidade de aprendizado e que ocorre de forma crônica e irreversível (GUARINO *et al.*, 2019).

As principais manifestações patológicas observadas na DA (Figura 1) são a perda neuronal e de sinapses, a presença de placas neuríticas extracelulares desde o estágio inicial da doença e de emaranhados neurofibrilares intracelulares na fase tardia, onde na primeira se evidencia a participação da proteína beta amiloide, e na última da proteína tau (HE *et al.*, 2018; JACK *et al.*, 2019). Associado a essas características, nota-se também o desenvolvimento de neurites distróficas nos arredores das placas neuríticas, isto é, inflamações nas regiões dos dendritos e dos axônios (DETURE; DICKSON, 2019).

Adicionalmente, são constatadas alterações nos astrócitos e micróglia, células presentes no sistema nervoso central que modulam o funcionamento e a

sinalização dos neurônios (RASBAND, 2016). Com isso, a depender do estágio da doença, os astrócitos podem sofrer variadas modificações decorrentes da inflamação cerebral, que podem levar à perda de função, ou até mesmo à proliferação e hipertrofia dos astrócitos, fenômeno conhecido como astrogliose reativa (VERKHRATSKY *et al.*, 2019). Ademais, como resposta à lesão neural na DA, ocorre a ativação das células micrógliais, pertencentes ao sistema imune, que tem a capacidade de induzir a produção de mediadores proinflamatórios, gerando neurotoxicidade e aumentando o processo neuroinflamatório (AHMAD; FATIMA; MONDAL, 2019).

Figura 1 - Características patológicas definidoras da doença de Alzheimer.



Fonte: Adaptado de (CONGDON; SIGURDSSON, 2018).

As placas neuríticas, ou placas beta amilóide (βA) mencionadas previamente, se desenvolvem devido a alterações nas atividades das enzimas β e γ secretase, que realizam a clivagem anormal das proteínas precursoras da amilóide (PPA), fato que leva à acumulação dos peptídeos βA (RICCIARELLI; FEDELE, 2017). As PPA apresentam este comportamento aberrante devido à mutações em sua estrutura, bem como nos genes presenilina-1 (PSEN-1) e presenilina-2 (PSEN-2), que são responsáveis pela produção das presenilinas, proteínas constituintes da subunidade catalítica do complexo γ secretase (LANOISELÉE *et al.*, 2017).

Já os emaranhados neurofibrilares são resultantes de alterações pós-traducionais da proteína tau, tais como a hiperfosforilação, oxidação, nitratação e

glicação, onde a primeira apresenta maior influência na patologia por conta do grande número de sítios alterados na tau ocupando 85 sítios, enquanto a glicação se classifica em segundo lugar ocupando 12 sítios (MARTIN; LATYPOVA; TERRO, 2011). Essas reações químicas se originam a partir do envelhecimento da proteína, são irreversíveis, cumulativas e costumam afetar o tempo de vida destas biomoléculas, bem como causar disfunções em geral (JAISSON; GILLERY, 2010).

A proteína tau se liga aos microtúbulos, estrutura presente na célula que regula o crescimento e eventos de sinalização celular, para facilitar o sistema de desenvolvimento e transporte neuronal (YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2020). Quando ocorre um desequilíbrio nas atividades enzimáticas das quinases (aumento) e das fosfatases (diminuição), a tau se torna hiperfosforilada, causando uma despolimerização dos microtúbulos e agregação de oligômeros da proteína tau, posteriormente formando os emaranhados neurofibrilares (MOKHTAR *et al.*, 2013).

Também é levada em conta a atuação dos radicais livres na DA, já que há maior acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em indivíduos mais velhos, situação que provoca danos em vários componentes celulares (CHRISTEN, 2000). Este fenômeno de produção exacerbada de substâncias oxidantes no organismo, e consequente interrupção da sinalização redox induzindo à danos moleculares é intitulado como estresse oxidativo (SIES, 2020).

Essencialmente, os neurônios apresentam grande tendência em serem atacados pelos radicais livres, tendo em vista a baixa quantidade do antioxidante glutathione, substância primordial para a detoxificação das ROS no cérebro. Além disso, há influência do alto percentual de ácido graxos poli-insaturados nas membranas neuronais, e a grande quantidade de oxigênio requerida para o metabolismo cerebral (CHRISTEN, 2000). Inclusive, é amplamente relatada a participação de determinados metais na produção das ROS, como o ferro, alumínio, mercúrio cobre e zinco, havendo maior incidência do envolvimento do metabolismo do ferro na DA (SINGH, A. *et al.*, 2019).

A partir do estresse oxidativo, acabam por ser produzidas espécies que podem trazer uma resposta prejudicial às células neuronais, como os produtos derivados da peroxidação lipídica, as proteínas carboniladas, os produtos proteicos de oxidação avançada, e os produtos finais de Glicação avançada (AGEs) (JAISSON; GILLERY, 2010). A disposição destes produtos oriundos de modificações pós-traducionais provocadas pelo estresse oxidativo na região cerebral são conhecidos pela promoção da agregação biomolecular, característica marcante na patologia da DA (SCHAFFERT; CARTER, 2020).

Uma série de estudos científicos inferiram que o processo patológico primário da DA se concentra no acúmulo de formas patológicas da β A, que possibilitam a oligomerização e formação das placas neuríticas, gerando uma resposta inflamatória e desencadeando estresse oxidativo nos neurônios, que impedem a atividade normal das enzimas quinase e fosfatase, levando à fosforilação da proteína tau e formação dos emaranhados neurofibrilares. Esta cascata de eventos ocasionaria a morte dos neurônios e produziria a demência na DA (GHOSH; CÁRDENAS; OSSWALD, 2016).

Por isso, alguns pesquisadores trabalham na obtenção de medicamentos que impossibilitam ou reverterem o acúmulo das β A, tendo como exemplo o recente fármaco aprovado Aducanumab (DUNN; STEIN; CAVAZZONI, 2021). Com menor recorrência, também são avaliados potenciais inibidores das enzimas β e γ secretase (ZHAO *et al.*, 2020) apesar de não haver nenhum medicamento aprovado pelas agências regulamentadoras com estes alvos moleculares. Entretanto, estas enzimas podem não constituir alvos moleculares interessantes para a DA devido à capacidade destas processarem grande quantidade de substratos envolvidos em inúmeros eventos fisiológicos (RICCIARELLI; FEDELE, 2017).

Até o presente momento não foi encontrada a exata etiologia da DA, restando apenas a elaboração de hipóteses para fundamentar as causas da doença. Por isso, alvos moleculares envolvidos nos eventos intermediários patológicos da DA tem sido objeto de estudo para o desenvolvimento de terapias.

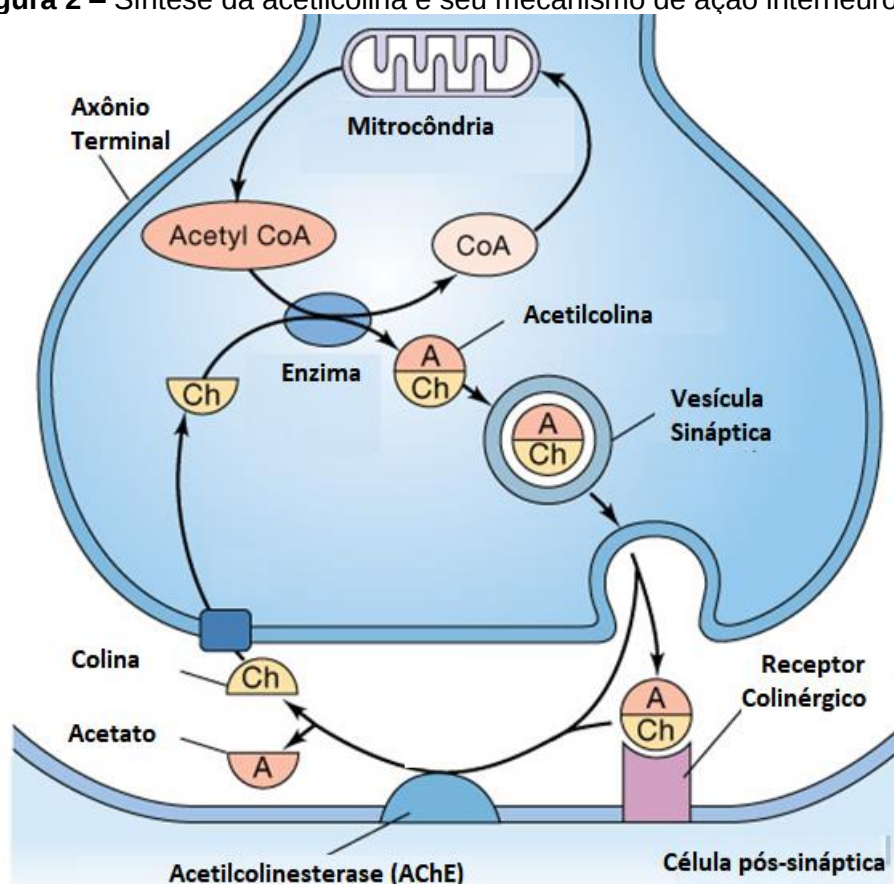
Particularmente, o uso de neurotransmissores como alvo molecular para tratamentos que amenizam os sintomas da DA tem se mostrado a via mais efetiva e utilizada pelos medicamentos aprovados para uso, sendo a acetilcolina o neurotransmissor mais aplicado neste sentido.

A acetilcolina atua como um mensageiro químico na transmissão de sinais através das sinapses e junções neuromusculares (KANDIMALLA; REDDY, 2017), suportando adicionalmente outros papéis essenciais, atuando na função autonômica do sistema nervoso periférico, como regulador do sono e da vigília, e na aprendizagem e memória no sistema nervoso central (BERTRAND; WALLACE, 2020).

A acetilcolina é sintetizada a partir da acetilcoenzima A (Acetil CoA) originada da mitocôndria e da colina, sendo a reação catalisada pela enzima colina acetiltransferase (Figura 2). Então, a acetilcolina é armazenada em vesículas e liberada pelas fendas sinápticas, onde o excesso da mesma é rapidamente quebrada pela enzima Acetilcolinesterase em acetato e colina. Com isso, a colina é transportada para o axônio terminal e é usada para fazer mais acetilcolina (GAUTHIER, 2002). Desta forma, a acetilcolina, os receptores e as enzimas atuantes nesse mecanismo descrito são nomeados de sistemas de transmissão colinérgica.

Devido ao grande envolvimento da acetilcolina nas atividades cerebrais, e tendo em vista que os principais sintomas da DA consistem no comprometimento cognitivo e de memória, é extensamente discutida a hipótese colinérgica, onde o déficit no sistema colinérgico está diretamente relacionado com a DA e o envelhecimento (BARTUS *et al.*, 1982).

Figura 2 – Síntese da acetilcolina e seu mecanismo de ação interneuronal.



Fonte: Adaptado de <https://socratic.org/questions/what-is-the-role-of-acetylcholinesterase-at-a-synapse-1>.

Esta hipótese apresenta inúmeros fundamentos baseados experimentalmente, sabendo-se que há a alteração de marcadores colinérgicos em pacientes com déficit cognitivo, além do que a indução do aumento da atividade colinérgica se mostra benéfica em problemas cognitivos relacionados a idade (DOUCHAMPS; MATHIS, 2017). Ademais, evidências científicas relatam que a enzima catalisadora da síntese de acetilcolina é reduzida entre 50 e 95% no cérebro de pacientes com DA, além de se notar a consequente redução na quantidade de acetilcolina e de acetilcolinesterase (GIACOBINI, 1990).

Em suma, partir destes fatos foi provado que os tratamentos que estimulam a função colinérgica são fundamentais para a terapia de pacientes com a DA. Por este motivo, substâncias que potencialmente provocam a inibição da enzima

acetilcolinesterase, e que por isso induzem à permanência de maior quantidade de acetilcolina no cérebro, são pesquisadas com o intuito de se encontrar um tratamento definitivo para a DA.

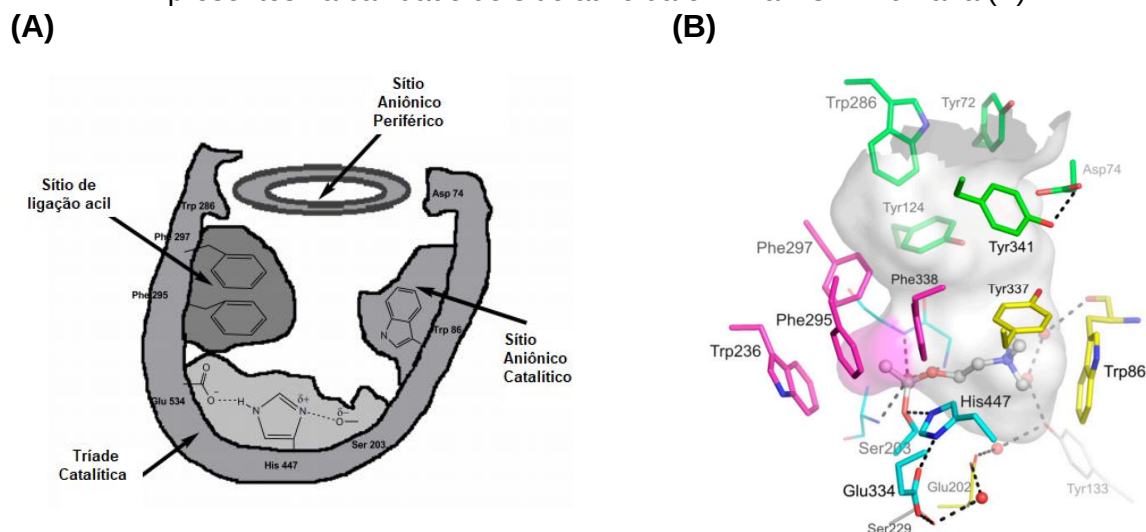
1.2 Acetilcolinesterase

A AChE é uma glicoproteína integrante do grupo das serina hidrolase. Na forma monomérica, esta enzima possui 537 aminoácidos, contendo 14 hélices α envolvendo 12 folhas β estruturadas na forma elipsoidal (CHOUDHARY, 2015; COLOVIC *et al.*, 2013). A área onde se encontra o sítio ativo da AChE apresenta uma profunda cavidade com entrada limitada, com regiões distintas: o sítio catalítico (SC) e o sítio aniônico periférico (SAP). O SC é formado por dois outros subsítios: o subsítio aniônico catalítico (SAC) e o subsítio estearásico (BRAHMACHARI, 2017). A Figura 3 demonstra as regiões presentes no sítio ativo e os resíduos de aminoácidos presentes na cavidade catalítica.

O SAC conhecido como subsítio de ligação da colina possui resíduos de aminoácidos aromáticos que interagem com a amina quaternária presente na estrutura do substrato ACh, repercutindo em interações cátion- π . O SAC possui papel fundamental na hidrólise da ACh, tendo em vista que este subsítio direciona o substrato em sua posição correta em relação ao arcabouço proteico do sítio catalítico (BAJDA *et al.*, 2013).

O subsítio esterásico, também conhecido como tríade catalítica, possui padrão de aminoácidos comum ao grupo das serina hidrolase, contendo os resíduos de serina, histidina e o grupo carboxil oriundo do ácido glutâmico. A cavidade catalítica da AChE possui outras duas regiões importantes: o sítio de ligação acil e a cavidade oxiânion. O sítio de ligação acil, composta por resíduos de triptofano e fenilalanina, tem a função de controlar a especificidade do substrato que pode adentrar no sítio ativo, proibindo que grandes moléculas o acessem. A cavidade oxiânion é constituída de resíduos de glicina e alanina, doadores de ligações de hidrogênio e tem o papel de estabilizar o composto intermediário existente na hidrólise da ACh (BAJDA *et al.*, 2013).

Figura 3 - Características estruturais do sítio ativo da AChE (A). Resíduos de aminoácidos presentes na cavidade do sítio ativo da enzima AChE humana (B).



Fonte: Adaptado de (COLOVIC *et al.*, 2013) (A) e (ROSENBERRY *et al.*, 2017) (B).

O SAP se localiza na entrada da cavidade catalítica a 20 Å de distância do SAC, portanto é o primeiro local a interagir com a ACh durante o mecanismo de catálise. Adicionalmente, é conhecido o envolvimento do SAP em casos modulação alostérica da AChE, bem como em modificações conformacionais ocasionadas por inibidores enzimáticos (JOHNSON; MOORE, 2006). O SAP também tem sido apontado como o sítio de ligação de maior interação com moléculas inibidoras da AChE (BAJDA *et al.*, 2013; VARADARAJU *et al.*, 2013).

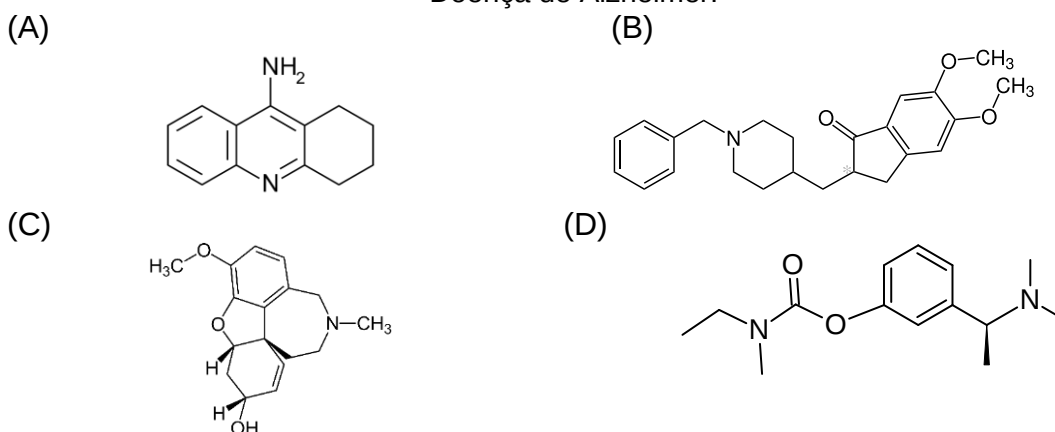
1.3 Inibidores da Acetilcolinesterase

Atualmente existem 4 inibidores da AChE aprovados dentre os 5 utilizados em terapias para a doença de Alzheimer: tacrina, donepezil, rivastigmina e galantamina. A tacrina (Figura 4(A)) pertence ao grupo dos derivados de acridinas, sendo o primeiro fármaco autorizado para uso comercial atuando na inibição da AChE para a terapia em doença de Alzheimer (DAVIS; POWCHICK, 1995). Esta molécula foi utilizada originalmente como estimulante respiratório, sendo reposicionada para tratar a doença de Alzheimer em 1980 (SHARMA, 2019). A tacrina inibe a AChE de forma reversível e mista, sendo não-competitiva a baixas concentrações e competitiva em altas concentrações (AGATONOVIC-KUSTRIN; KETTLE; MORTON, 2018). Isso significa que sua forma de interagir com a AChE

e, portanto, seu comportamento em meio biológico difere de acordo com a concentração do medicamento. Isto pode se traduzir em complicações em relação à farmacocinética e farmacodinâmica da substância, pois sabe-se que a concentração de um fármaco não se mantém constante ao percorrer pelo organismo, podendo desta maneira gerar efeitos diferentes a depender da sua dose. Esta droga interage por meio de empilhamento π - π com os resíduos Trp84 e Phe330 presentes no sítio catalítico aniônico, além de conseguir penetrar a barreira hematoencefálica (HAREL *et al.*, 1993). Contudo, o medicamento foi descontinuado por ter baixa biodisponibilidade oral e provocar severos efeitos colaterais no fígado.

O donepezil (Figura 4(B)) é um medicamento constituinte da classe das N-benzilpiperidinas utilizado desde 1996 para a doença de Alzheimer. Esta droga tem boa biodisponibilidade e ultrapassa a barreira hematoencefálica. O donepezil inibe a AChE de forma reversível e apesar de interagir dualmente no SAC e no SAP, apresenta inibição não-competitiva por não entrar em contato diretamente com a tríade catalítica e a cavidade oxiânion (SHARMA, 2019). No que diz respeito às interações intermoleculares com o sítio ativo da enzima, o grupo indanona do donepezil demonstra forte interação π - π com o resíduo Trp279 do SAP, já o nitrogênio do grupo piperidínico forma uma interação cátion- π com o resíduo Phe330 do SAC, enquanto a porção do anel benzila forma interações por empilhamento π - π no Trp84 do SAC (KRYGER; SILMAN; SUSSMAN, 1999).

Figura 4 - Drogas inibidoras da acetilcolinesterase aprovadas para tratamento da Doença de Alzheimer.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Galantamina (Figura 4(C)) é um alcalóide natural, que age inibindo a AChE competitivamente e de forma reversível. Este medicamento interage diretamente com o SAC pelo Trp84 por interações π - π com o anel de ciclohexeno do composto e pelos resíduos Phe330 e Ser200 por meio de ligações de hidrogênio (MARCO-CONTELLES *et al.*, 2006).

A Rivastigmina (Figura 4(D)) é um carbamato que inibe a AChE de maneira pseudo-irreversível e competitiva. No Sistema AChE-Rivastigmina, o composto é clivado em duas partes: o do grupo carbamato e o grupo de saída da Rivastigmina. O grupo carbamato se liga covalentemente à tríade catalítica da AChE por meio do resíduo Ser200, impedindo qualquer interação com o substrato por um longo período. Já o grupo de saída permanece no sítio de ligação, estabilizado pelas interações π - π entre o seu grupo fenólico e os resíduos aromáticos Trp84 e Phe330 do SAC (BAR-ON *et al.*, 2002).

Além destes compostos, pesticidas derivados de organofosfatos demonstram a capacidade de inibir a AChE irreversivelmente, acumulando-se no sistema nervoso central e periférico, consequentemente trazendo sintomas como insuficiência respiratória, convulsões, e falência múltipla de órgãos (LORKE; PETROIANU, 2019).

Atualmente, o desenvolvimento de drogas para o tratamento de Alzheimer se baseia na obtenção de compostos híbridos contendo a junção de grupos moleculares presentes nos fármacos comerciais, além de se almejar a produção de uma única droga multi-alvo, fato justificável devido à complexidade da doença.

Alguns grupos moleculares se mostram privilegiados no que diz respeito à capacidade de inibição da AChE. Como a cavidade catalítica da AChE em sua grande parte é constituída de resíduos de aminoácidos aromáticos, compostos contendo grupos pirimidina (VALASANI *et al.*, 2013), indazóis (TZVETKOV *et al.*, 2019) e quinolinas (FERNÁNDEZ-BACHILLER *et al.*, 2010) se mostram bastante efetivos como inibidores, sendo capazes de atuar a nível do SAC e do SAP (GUZIOR *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2018).

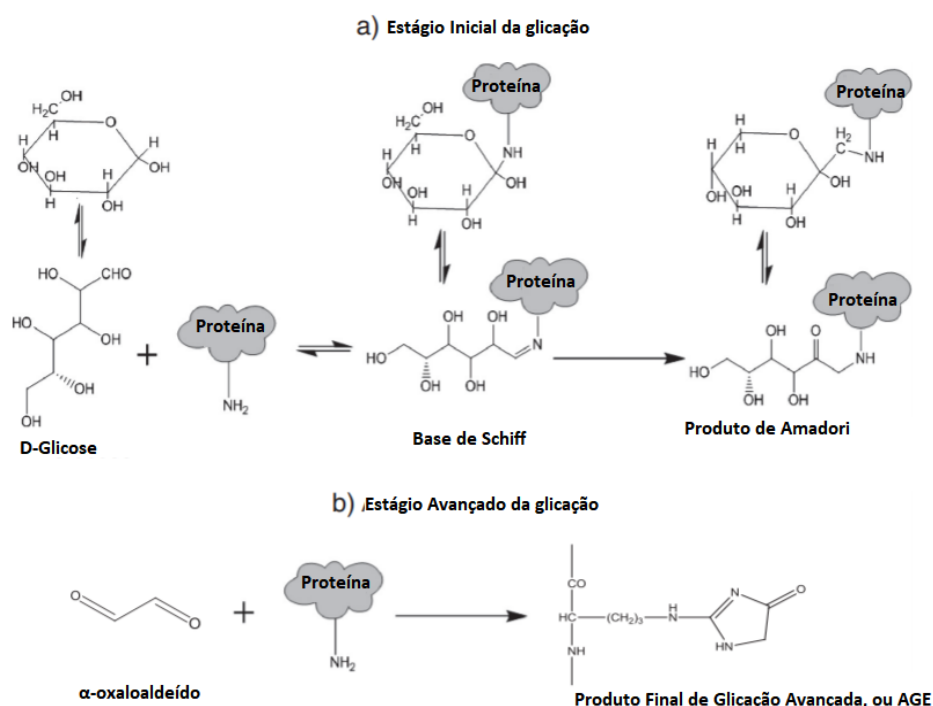
1.4 Produtos Finais de Glicação Avançada

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são compostos formados através da glicação e oxidação não enzimática de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos decorrente do contato com carboidratos simples como glicose e frutose (SELLEGOUNDER *et al.*, 2021). Este evento é chamado de reação de Maillard, e ocorre tanto no organismo humano quanto em alimentos processados contendo carboidratos e proteínas (NAGAI *et al.*, 2014).

Com o decorrer da idade e/ou em casos onde há desvios metabólicos como a hiperglicemia e hiperlipidimia, estresse oxidativo e presença de processos inflamatórios, há grande tendência na acumulação dos AGEs pelo organismo (MEERWALDT *et al.*, 2008). Além disso, existe o conhecimento por especialistas da área acerca da forte contribuição das AGEs no declínio de funções motoras envolvidas no envelhecimento normal das células e tecidos (DRENTH *et al.*, 2016).

O processo de formação das AGEs (Figura 5) é iniciado com a etapa reversível de reação entre os grupos nucleofílicos das biomoléculas com grupos carbonílicos reativos dos açúcares, formando as instáveis bases de Schiff. Em seguida ocorrem uma série de rearranjos para formar substâncias mais estáveis, gerando os produtos de Amadori. Na etapa intermediária, os produtos de Amadori se degradam levando ao surgimento de variados compostos dicarbonílicos reativos como glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglicosona, entre outros. Na fase tardia, as sucessivas reações promovidas pela glicação levam à formação dos irreversíveis AGEs (ANGUIZOLA *et al.*, 2013; GOLDIN *et al.*, 2006). Esta sequência de reações ocorrem de forma lenta, podendo levar meses para se completarem (VETTER, 2015).

Figura 5 – Processo de Glicação de proteínas, desde o estágio inicial até a formação dos AGEs.



Fonte: Adaptado de (ANGUIZOLA *et al.*, 2013).

A depender do pH, da temperatura, dos reagentes envolvidos no meio de reação, o tipo de produto de Amadori formado pode variar, influenciando na composição do AGE (STADLER; STUDER, 2015). Os AGEs possuem cor marrom amarelada, e formam adutos insolúveis e fluorescentes que se acumulam em proteínas de meia vida longa. A Glicação afeta todas as proteínas do corpo humano, sejam elas intracelulares, extracelulares ou da circulação (FOURNET; BONTÉ; DESMOULIÈRE, 2018). As proteínas modificadas pelos AGEs podem perder as suas funções fisiológicas e consequentemente ocasionar a degradação destas havendo a liberação dos AGEs no organismo, que são extremamente prejudiciais para a saúde (SINGH *et al.*, 2014).

De forma adicional, a acumulação dos AGEs no organismo propicia a formação de ligações cruzadas entre as proteínas modificadas resistentes a proteases, levando à formação de agregados de proteínas e de fibrilas amiloide acumulados no corpo. Estes agregados se originam a partir da formação de ligações covalentes entre os AGEs, da oxidação do enxofre das pontes dissulfeto

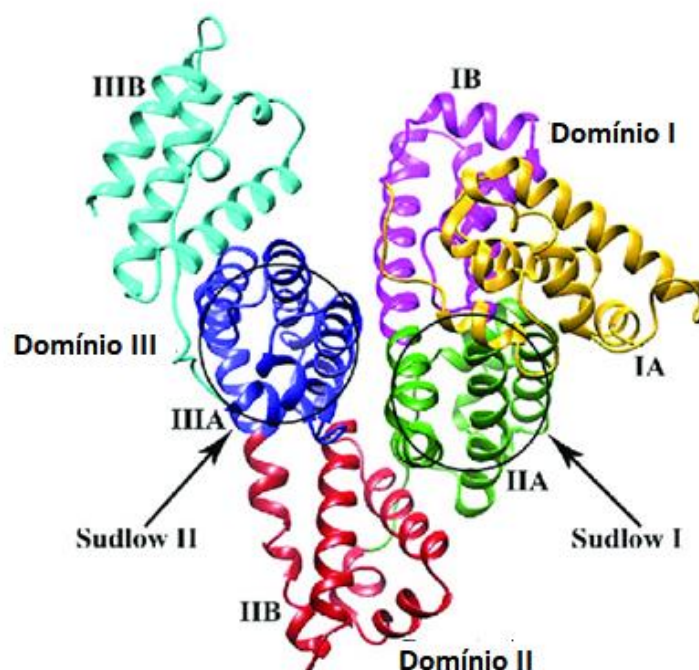
das proteínas, além da formação de novos grupos reativos formados na proteína no decorrer do processo de obtenção dos AGEs (FOURNET; BONTÉ; DESMOULIÈRE, 2018).

Segundo diversos autores, é notório o envolvimento dos AGEs no desenvolvimento da doença de Alzheimer, tendo em vista que o processo de amiloidose constitui etapa importante na patogênese da DA (MÜNCH *et al.*, 1997; SASAKI *et al.*, 1998; VITEK *et al.*, 1994). Além disso, estudos demonstram a presença de AGEs em placas senis e emaranhados neurofibrilares identificados através da imuno-histoquímica, evidenciando sua influência nesta desordem (SMITH *et al.*, 1994).

1.5 Albumina Sérica

A albumina sérica humana (HSA) ilustrada na Figura 6, proteína majoritária no plasma, dentre diversas funções, protagoniza o transporte tanto de compostos endógenos quanto de exógenos pelo sistema circulatório (YAMASAKI *et al.*, 2013). A HSA é uma proteína globular com estrutura cristalina em formato de coração, havendo em sua estrutura secundária 67% de hélices α , 23% de cadeias estendidas, e 10% de folhas- β (PETERS JR, 1995). A HSA possui 585 resíduos de aminoácidos, possuindo apenas um resíduo de triptofano (Trp-214) em toda sua estrutura (BIRKETT; MYERS; SUDLOW, 1977). A HSA também possui 35 resíduos de cisteína, onde 34 destes participam de ligações dissulfeto intramoleculares, e um nomeado de cisteína-34 (cis-34) representa 80% dos grupos tiol no plasma (MACIĄŻEK-JURCZYK *et al.*, 2018).

Figura 6 - Estrutura da albumina sérica humana (HSA) com a representação dos domínios, subdomínios e locais de ligação de Sudlow I e II.



Fonte: (MONDAL; KRISHNA; SAKTHIVEL, 2017).

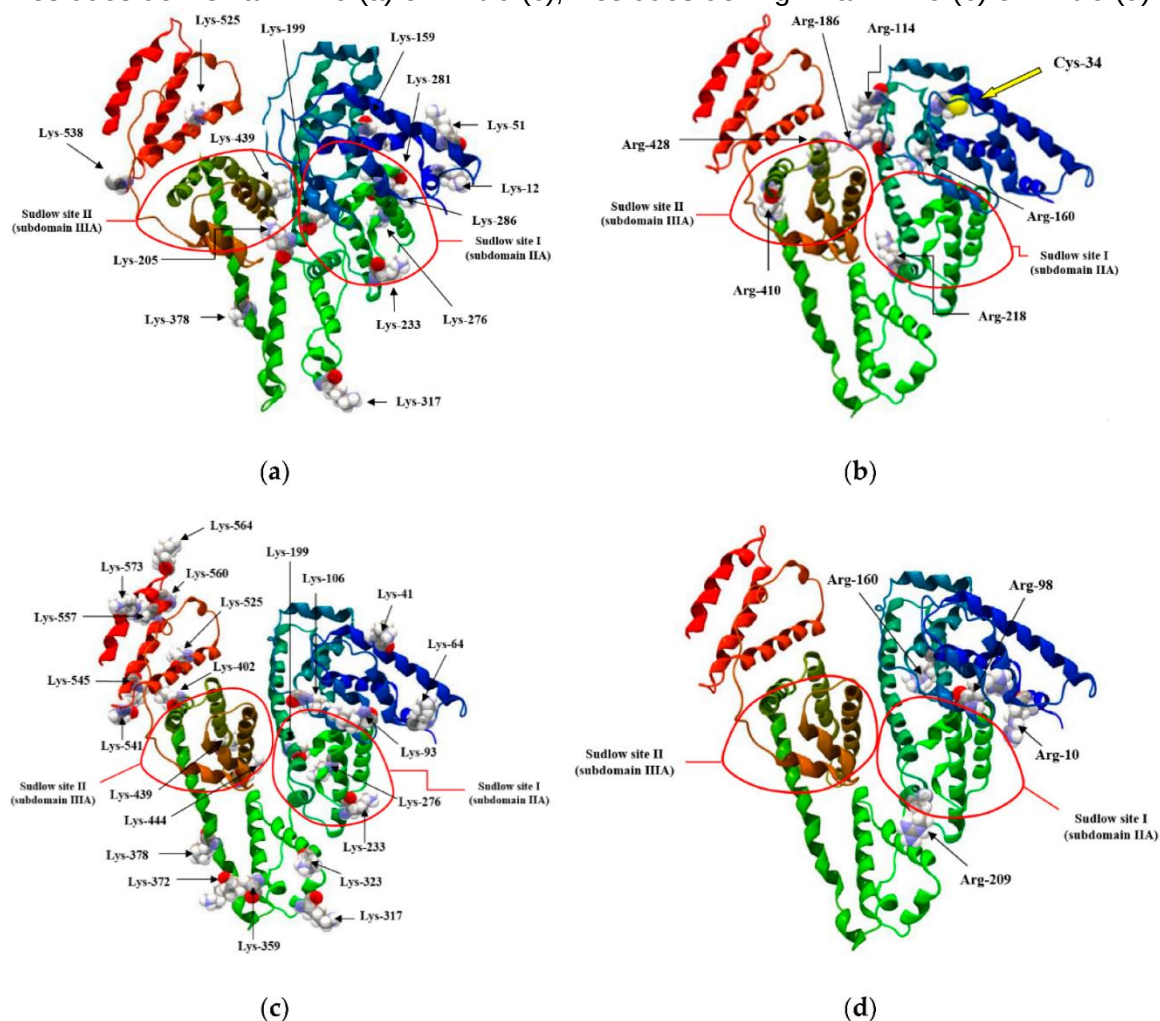
Seus sítios de ligação são constituídos de três domínios homólogos I, II e III, que se dividem em subdomínios A e B (SUGIO *et al.*, 1999). A HSA possui três principais sítios de ligação, localizados do subdomínio IIA (Sudlow Site I), subdomínio IIIA (Sudlow Site II) e subdomínio IB (sítio III) (SUDLOW; BIRKETT; WADE, 1976; ZSILA, 2013), e demonstra uma marcante habilidade em formar complexos com xenobióticos, influenciando diretamente na farmacocinética de tais substâncias (FAISAL *et al.*, 2020). Desta forma, a força de ligação ou de afinidade é de grande importância em estudos de interação de xenobióticos com proteínas transportadoras, tendo em vista que a biodistribuição de pequenas moléculas no organismo e seu potencial de toxicidade podem ser avaliados por tal parâmetro (POÓR *et al.*, 2017).

Em desordens onde ocorre a alteração do metabolismo, como a doença de Alzheimer e diabetes, além de doenças cardiovasculares, é comum haver elevado percentual de glicação da HSA no plasma humano (COSTA *et al.*, 2019). Nesses casos, tanto a estrutura quanto a funcionalidade da HSA pode sofrer modificações (ANGUIZOLA *et al.*, 2013). Por conta disso, a eficiência dos sítios ligantes da HSA

pode ser alteradas, tendo em vista a ligação da glicose em sítios específicos (Figura 7) (OETTL; STAUBER, 2007).

Devido ao seu forte caráter nucleofílico, os resíduos de lisina (Lis) e arginina (Arg) e a cis-34 são os resíduos de aminoácidos mais sensíveis para glicação HSA *in vivo* e *in vitro* (RONDEAU; BOURDON, 2011). A glicação da HSA ocorre em inúmeros sítios, sendo a Lisina-525 localizada no domínio III o sítio mais ocupado, correspondendo a 33% da Glicação (IBERG; FLÜCKIGER, 1986). Além da Lis-525, outros aminoácidos apresentam papel fundamental na interação de fármacos com os sítios ligantes da HSA dentre eles: Arg-410 (localizado no sítio de ligação II), Lis-199, e Arg-218 (que se encontram localizados na entrada do sítio I) (SZKUDLAREK *et al.*, 2016).

Figura 7 - Localização dos principais resíduos de aminoácidos envolvidos na Glicação. Resíduos de Lisina *in vivo* (a) e *in vitro* (c); Resíduos de Arginina *in vivo* (b) e *in vitro* (d).

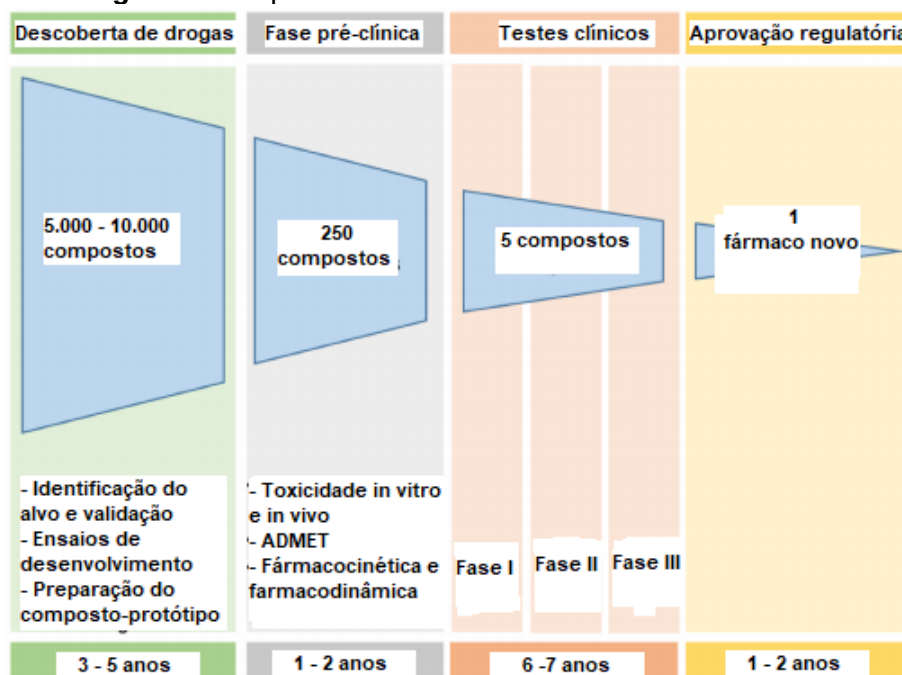


Fonte: (SZKUDLAREK; POŻYCKA; MACIĄŻEK-JURCZYK, 2019).

1.6 Reposicionamento de fármacos

O desenvolvimento de novas drogas terapêuticas é um procedimento que demanda um longo período, além de exigir uma série de etapas que necessitam de grande suporte financeiro (TIWARI *et al.*, 2012). Como observado na Figura 8, este processo leva de 11 a 16 anos, onde o principal obstáculo consiste na etapa de descoberta de drogas, onde milhares de compostos são estudados num período médio de 4 anos, apenas cerca de 250 moléculas são aprovadas para estudos pré-clínicos, 5 são submetidas a testes clínicos e apenas uma droga é aprovada para uso comercial (MATTHEWS; HANISON; NIRMALAN, 2016).

Figura 8 - Etapas envolvidas na descoberta de fármacos.



Fonte: Adaptado de (MATTHEWS; HANISON; NIRMALAN, 2016).

Devido a isto, estudos sobre o redirecionamento e aumento da biodisponibilidade de fármacos já comercializados passaram a integrar um tópico importante nas pesquisas envolvendo a descoberta de drogas, tendo em vista que o mecanismo de ação destes já se encontram bem estabelecidos, facilitando o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos mais eficazes.

O reposicionamento ou reaproveitamento de fármacos, é uma estratégia na área de descoberta de drogas caracterizada pelo uso de medicamentos já existentes em indicações terapêuticas diferentes do seu direcionamento original (PARVATHANENI *et al.*, 2019). Como estes compostos já passaram pelos processos avaliativos de biodisponibilidade e a farmacologia já se encontra bem descrita em literatura, se torna facilitada a aprovação da droga para entrar em fases onde são realizados os testes clínicos (YELLA *et al.*, 2018).

Esta técnica permite que haja o encurtamento do período de desenvolvimento do fármaco e menor investimento, considerando a existência prévia de ensaios regulatórios de segurança do medicamento (XUE *et al.*, 2018). Estudos reportam que cerca de 30% das drogas aprovadas nos últimos anos são reposicionadas, contrastando com 6% de drogas admitidas pela primeira vez, reforçando o crescimento desta estratégia na descoberta de drogas (YELLA *et al.*, 2018).

Para reportar novas funcionalidades a moléculas conhecidas, são requeridos de 1 a 2 anos para a triagem e identificação das drogas que respondem a novos alvos moleculares e em média 8 anos para o desenvolvimento de testes clínicos com o fármaco reposicionado e o registro pelas agências regulamentadoras, tempo reduzido em relação às estratégias tradicionais (SERTKAYA *et al.*, 2014).

A etapa de triagem pode ser realizada experimentalmente através de ensaios de interação alvo molecular-droga e triagem fenotípica, onde neste último as drogas são identificadas a partir de observações experimentais de alteração em células e animais ao entrar em contato com a droga. Esta etapa também pode ser feita com base em estudos de simulação computacional, existindo uma infinidade de estratégias envolvendo a bioinformática (PARVATHANENI *et al.*, 2019). Para fins de exemplificação, a Tabela 1 relaciona uma série de fármacos autorizados para reposicionamento.

Tabela 1 - Exemplos de drogas reposicionadas aprovadas.

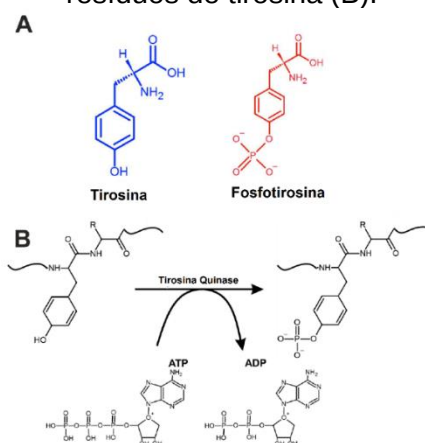
Fármaco	Uso original	Reposicionamento	Referência
Itraconazol	Antifúngico	Anticancer	(PANTZIARKA <i>et al.</i> , 2015)
Aspirina	Inflamação, dor	Antiplaquetário	(PADHY; GUPTA, 2011)
Gemcitabina	Antiviral	Anticancer	(HERNANDEZ <i>et al.</i> , 2017)
Sildenafil	Angina	Disfunção erétil, hipertensão pulmonar	
Talidomida	Enjoo	Mieloma múltiplo	(AZVOLINSKY, 2017)
Tamoxifeno	Câncer de mama metastático	Desordem bipolar	(MUTHYALA, 2011)
Metformina	Diabetes tipo II	Câncer de próstata avançado	(KASZNICKI; SLIWINSKA; DRZEWSKI, 2014)
Naproxeno	Inflamação, dor	Doença de Alzheimer	(PADHY; GUPTA, 2011)

Fonte: Compilado pela autora.

1.7 Inibidores da tirosina quinase

As Tirosina Quinase (TQ) são uma classe de enzimas que catalisam a transferência de grupos fosfato presentes no ATP para os resíduos de tirosina de proteínas que atuam no organismo (Figura 9). Essa fosforilação interfere em diversos processos bioquímicos e fisiológicos, além de atuar na proliferação, migração, formação de tumores e morte celular (JIAO *et al.*, 2018; WANG; COLE, 2014). Por isso, alterações na atividade destas enzimas podem ocasionar uma série de doenças no corpo humano, destacando-se o câncer (DRAKE; LEE; WITTE, 2014).

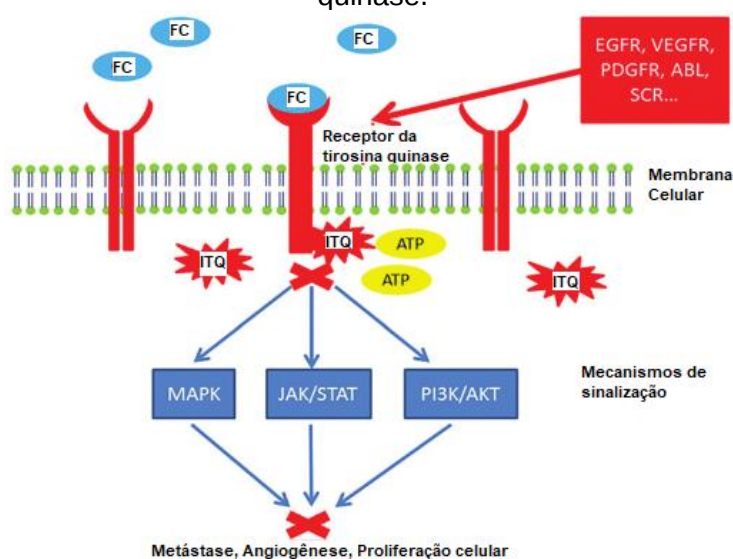
Figura 9 - Estrutura química da tirosina e da fosfotirosina (A) e reação de fosforilação dos resíduos de tirosina (B).



Fonte: Adaptado de (ABRAMCZYK *et al.*, 2019).

A Figura 10 demonstra de forma simplificada o mecanismo de ação das Tirosina Quinase e sua inibição. Os resíduos de tirosina passíveis de fosforilação se encontram presentes na porção intracelular dos receptores da tirosina quinase, onde estes são ativados pelos fatores de crescimento (FC), isto é, ligantes específicos que unem no domínio extracelular de cada tipo de receptor. Havendo a ligação receptor-FC, ocorre a dimerização do receptor em questão, que consequentemente leva à autofosforilação. Em decorrência disso, as TQ são ativadas, e a fração intracelular dos receptores se tornam sítios de ligação para adaptadores e moléculas sinalizadoras, que proporcionam a transmissão de sinais que controlam a expressão de genes e a apoptose, interferindo em situações como a metástase, a angiogênese e a proliferação celular (DU; LOVLY, 2018; JIAO *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2012). Como a fosforilação dos resíduos de tirosina constitui importante função na regulação do câncer, foram desenvolvidos medicamentos que impedem a atuação destas proteínas, sendo classificados como inibidores da tirosina quinase (ITQ). Estes inibidores substituem o ATP ou interagem de forma não-competitiva em seu sítio de ligação presente nos receptores da TQ, bloqueando o desencadeamento de respostas celulares (POTTIER *et al.*, 2020).

Figura 10 - Representação do mecanismo de ação celular dos inibidores da tirosina quinase.



Fonte: adaptado de (GABORA *et al.*, 2019).

Os ITQ são medicamentos considerados bem sucedidos na área de terapias baseadas em alvos biológicos. Em 2020, foram reportados 46 ITQ voltados para o tratamento de tumores aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), onde 21 destes apresentam potencial efeito em mais de um alvo biológico (ROSKOSKI JR, 2020). Esta atuação multi-alvo dos ITQs oportuniza o estudo destes em recuperação de outras enfermidades e até mesmo o melhoramento da eficácia da droga com base no redirecionamento do fármaco.

1.8 Cinética Enzimática

A avaliação da atividade de uma enzima pode ser analisada através do modelo de Michaelis-Menten. Neste modelo, as reações enzimáticas decorrem da ligação (interação) de uma enzima (E) ao seu substrato (S), ocasionando a formação de um complexo enzima-substrato (ES), e posteriormente ao produto da reação (P) e a enzima livre (Esquema 1). As constantes de velocidade para cada etapa da catálise levam à obtenção da constante K_m (Equação 1), compreendida como a concentração de substrato ($[S]$) no momento em que a velocidade da reação (v_0) atinge a metade da velocidade máxima da enzima ($V_{m\acute{a}x}$). O valor de K_m está associado à afinidade da enzima ao substrato, por isso são desejados valores pequenos para identificar alta afinidade. A equação de Michaelis-Menten representada na equação 2 relaciona a velocidade inicial da enzima à crescentes concentrações de substrato.



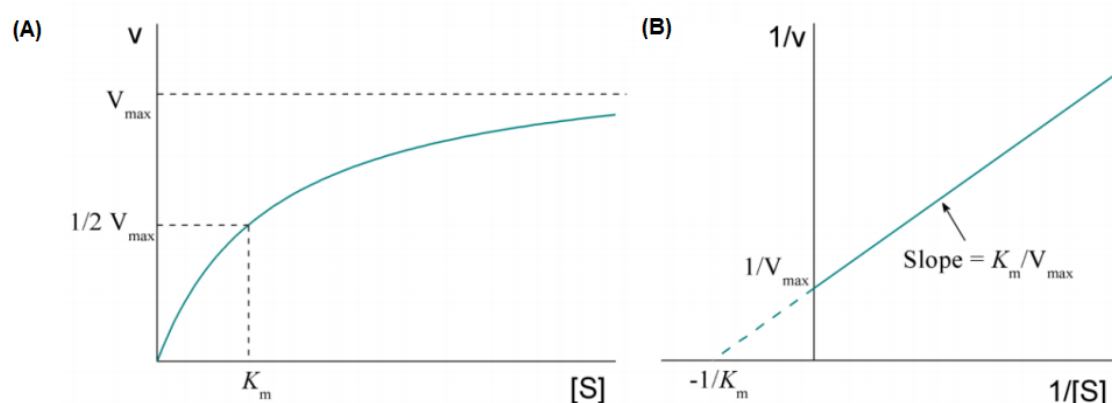
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 2})$$

De acordo com o modelo de Michaelis-Menten, a atividade de uma enzima aumentará de forma linear à concentração do substrato, até o ponto em que ocorrerá a saturação decorrente da formação do complexo ES. Neste ponto, a velocidade da reação não sofrerá influências significativas da adição de substrato, permanecendo constante como evidenciado no gráfico de Michaelis-Menten (Figura 11(A)). A linearização da equação de Michaelis-Menten produz a equação de Lineweaver-Burk (Equação 3) e conseqüentemente o gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 11(B)), facilitando desta forma o cálculo dos parâmetros cinéticos.

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Figura 11 - Gráfico da velocidade contra a concentração de substrato de acordo com a equação de Michaelis-Menten (A). Gráfico de Lineweaver-Burk, relacionando $1/v$ com $1/[S]$ (B).



Fonte: JIANG, 2013.

Com o gráfico de Lineweaver-Burk é possível identificar $V_{\text{máx}}$ pelo intercepto do eixo y e calcular o K_m pela inclinação da reta, onde $\text{inclinação} = K_m/V_{\text{máx}}$.

1.8.1 Inibição Enzimática

As enzimas tem apresentado protagonismo na descoberta de alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos, tendo em conta que a interação droga-enzima tem resposta instantânea e mecanismos bem estabelecidos (RAMSAY; TIPTON, 2017). Inibidores enzimáticos representam uma grande classe de medicamentos comercializados, podendo estes interagir com o seu alvo molecular de formas covalentes e não covalentes de forma a suprimir o efeito biológico das enzimas (HOLDGATE; MEEK; GRIMLEY, 2018).

A adição de um inibidor num sistema enzima-substrato modifica os parâmetros cinéticos da enzima, de forma a suscitar a compreensão do local onde o inibidor interage na estrutura da proteína e a maneira em que isto ocorre. Os inibidores enzimáticos podem ser reversíveis, pseudo-irreversíveis ou irreversíveis. Os inibidores irreversíveis se unem à enzima via ligação covalente, causando mudanças conformacionais no sítio ativo da enzima de forma a inativá-la permanentemente. Os inibidores pseudo-irreversíveis inicialmente se ligam covalentemente à enzima, entretanto a ligação é quebrada de forma lenta até a enzima retornar ao seu estado livre. Os inibidores reversíveis se ligam à enzima através de interações não-covalentes, e são classificados em: competitivos, acompetitivos, não-competitivos e mistos.

Inibidores competitivos buscam se ligar ao sítio ativo da enzima em competição com o substrato. Estes inibidores não afetam o intercepto do eixo y, mas modificam a inclinação do gráfico de Lineweaver-burk, ou seja, o $V_{\text{máx}}$ não é alterado e K_m aumenta (Figura 12(A)). Portanto, a equação de Michaelis-Menten para uma inibição competitiva altera o K_m através do K_i (Equação 4 e 5) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011):

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (\text{Eq. 4}) \quad K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \quad (\text{Eq. 5})$$

K_i é a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor e representa a afinidade do inibidor à enzima e $[EI]$ é a concentração do complexo enzima-inibidor. Inibidores incompetitivos se ligam à enzima somente quando o substrato se une ao sítio ativo, formando o complexo inativado enzima-substrato-inibidor (ESI). Devido a isso, o $V_{m\acute{a}x}$ e o K_m são gradualmente reduzidos em crescentes concentrações de inibidor incompetitivo devido à equação de Michaelis-Menten que é alterada de acordo com as equações 6 e 7 (Figura 12(B)). K_{is} representa a constante de dissociação do complexo enzima-substrato-inibidor, onde $[ES]$ é a concentração do complexo enzima-substrato e $[ESI]$ é a concentração do complexo enzima-inibidor-substrato (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right)} \quad (\text{Eq. 6}) \quad K_{is} = \frac{[ES] \cdot [I]}{[ESI]} \quad (\text{Eq. 7})$$

A inibição mista ocorre quando o inibidor pode se ligar tanto com a enzima livre quanto com o complexo enzima-substrato, interagindo de forma competitiva e incompetitiva (Figura 12(D)). Então, K_i e K_{is} levam ao decréscimo do $V_{m\acute{a}x}$ e o aumento do K_m (Equação 8) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

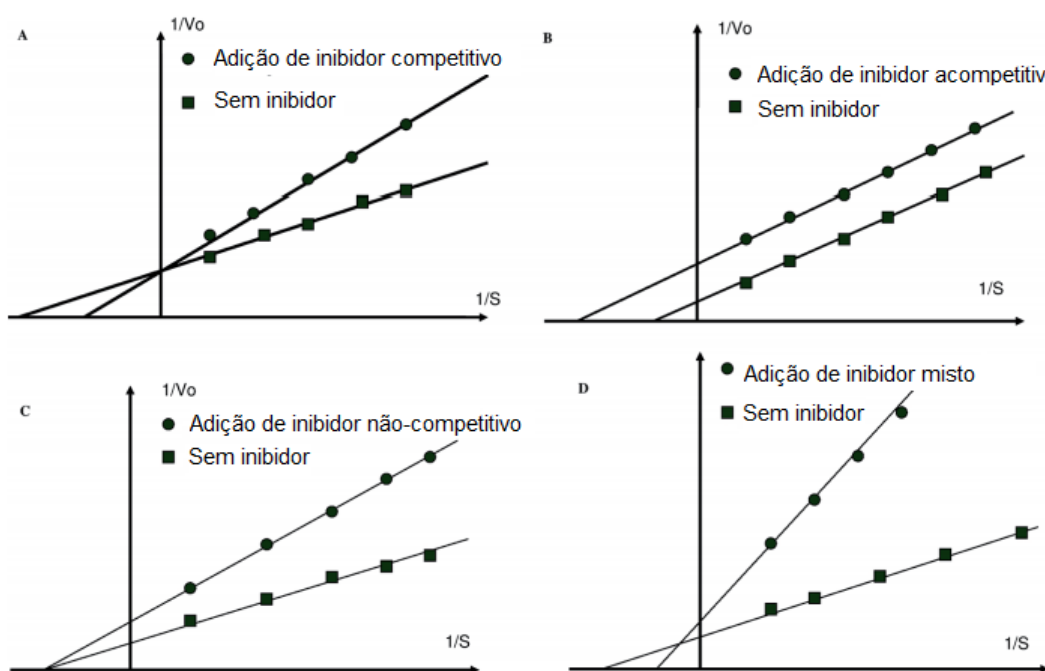
$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right)} \quad (\text{Eq. 8})$$

Similar ao inibidor misto, o inibidor não-competitivo pode se ligar simultaneamente à enzima livre e ao complexo enzima-substrato fora do sítio ativo da enzima. Por isso, para a equação de Michaelis-Menten no caso do inibidor não-

competitivo $K_i=K_{is}$ (Equação 9). Logo, a equação é modificada de maneira que $V_{m\acute{a}x}$ decresce com o aumento de concentração do inibidor e o K_m não é alterado (Figura 12(C)) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (\text{Eq. 9})$$

Figura 12 - Gráfico de Lineweaver-Burk para a inibição competitiva (A), Inibição acompetitiva (B), Inibição não-competitiva (C) e inibição mista (D)



Fonte: Adaptado de LOPINA, 2017.

1.9 Técnicas espectroscópicas para o estudo de interações droga-proteína

Em generalidade, o estudo experimental de interações ocorridas entre proteíνας e ligantes se baseiam em técnicas biofísicas, sendo a espectroscopia de fluorescência e a de UV-Vis as abordagens mais utilizadas devido à simplicidade operacional e a alta sensibilidade dos equipamentos. Na análise espectroscópica de interações entre biomacromoléculas e ligantes, são verificados os efeitos de

ligantes nos resíduos de aminoácidos cromóforos contidos nas proteínas, pois estes são detectáveis em tais estudos. Na presente tese são estudadas interações entre fármacos e duas proteínas: a albumina sérica humana e a acetilcolinesterase. A HSA possui um resíduo de triptofano, 20 de tirosina e 52 de fenilalanina espalhados pela estrutura da proteína (MACIĄŻEK-JURCZYK *et al.*, 2021), enquanto a AChE possui resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina em seu sítio ativo, sendo estes os protagonistas a serem monitorados nestas técnicas devido às suas propriedades cromóforas.

1.9.1 Supressão de fluorescência no estado estacionário

O estudo de interação via fluorescência é realizado considerando-se a supressão da intensidade da fluorescência intrínseca de um fluoróforo (no presente estudo, uma proteína) com a gradativa adição de um ligante. Este fenômeno ocorre pela interação de agentes supressores com os resíduos de aminoácidos aromáticos da proteína, sendo eles a tirosina (Tyr) e o triptofano (Trp), que no espectro de fluorescência apresentam emissão máxima em 303 nm e 340 nm, respectivamente.

Através da espectroscopia de fluorescência se torna possível a obtenção de parâmetros imprescindíveis para o estudo de interação droga-proteína. A equação de Stern-Volmer (Equação 10) identifica o mecanismo de supressão de fluorescência por intermédio da mudança da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) em função do aumento de temperatura.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot t_0 = 1 + K_{SV} [Ligante] \quad (\text{Eq. 10})$$

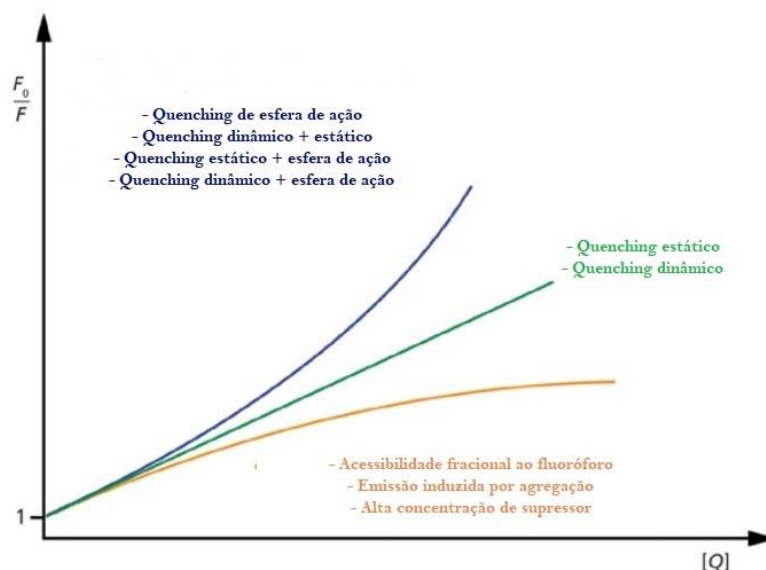
Onde F e F_0 é a intensidade de fluorescência no comprimento de onda de emissão máxima ($\lambda_{em\acute{m}\acute{a}x}$) na presença e ausência do supressor, respectivamente, $[Ligante]$ é a concentração do supressor adicionado no sistema, k_q é a constante bimolecular de supressão e t_0 é o tempo de vida da biomolécula na ausência do supressor.

O mecanismo de supressão de fluorescência é definido como estático ou dinâmico. O mecanismo estático envolve a formação de um complexo não-fluorescente entre o supressor e o fluoróforo, que se forma no estado excitado e permanece no estado fundamental (LAKOWICZ, 2013). O mecanismo estático é confirmado pela diminuição da K_{sv} de acordo com o aumento da temperatura (LAKOWICZ, 2013), uma vez que o crescimento de temperatura promove o enfraquecimento da interação presente no complexo (FAN *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2005).

Em contrapartida, o mecanismo dinâmico é dirigido pela transferência de energia do fluoróforo ao supressor no estado excitado, retornando ao estado fundamental sem a emissão de fóton (LAKOWICZ, 2013). No mecanismo dinâmico a K_{sv} aumenta sincronicamente com o aumento de temperatura, tendo em vista que nessas circunstâncias o contato entre o fluoróforo e o supressor é favorecido (FAN *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2005).

Em algumas situações pode ocorrer uma limitação no uso da equação de Stern-Volmer. A Figura 13 exemplifica o gráfico de Stern-Volmer e os possíveis desvios na linearidade da inclinação obtida da relação intensidade de fluorescência vs. concentração de supressor:

Figura 13 – Diagrama de gráficos de Stern-Volmer com padrão linear (verde), com desvio positivo (azul) e com desvio negativo (laranja) e as possíveis causas dos efeitos observados



Fonte: Adaptado de <https://www.spectroscopyonline.com/view/key-errors-avoid-consideration-fluorescence-quenching-data>

Uma extensa lista de fatores pode influenciar nesta circunstância (GEHLEN, 2020), observando-se em especial dois comportamentos que desviam da linearidade da equação mencionada e suas causas:

i. Desvio positivo

Há casos em que ocorre uma fraca interação entre o supressor e o fluoróforo apesar da alta proximidade entre estes, havendo a ausência de formação um complexo bimolecular estável, entretanto tal processo chega a se assimilar a uma supressão estática aparente (efeito pseudo-estático). Este evento é nomeado como mecanismo de esfera de ação e leva em consideração que no momento em que uma substância supressora e a substância suprimida se encontrar em uma região de forma esférica de volume V , o mecanismo de supressão se dará de modo estático (CASTANHO; PRIETO, 1998; GEHLEN, 2020). Experimentalmente, o gráfico F_0/F vs. [supressor] resultante de tais interações se dá pela modelo de inclinação com curvatura para cima, como observado na figura 13 e o modelo matemático utilizado para este tipo de

mecanismo é representada pela equação 11, onde V é o volume de esfera de ação e N é o número de avogrado:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV} [Ligante])e^{[ligante]VN} \text{ (Eq. 11)}$$

O desvio positivo também pode ser provocado pela mistura de mais de um mecanismo de supressão de fluorescência, chamado de mecanismo combinado. Nesta situação obtém-se duas constantes: K_S , representando as interações da fração que formou o complexo não-fluorescente, e K_D , refletindo a fração que atuou nas interações com o mecanismo dinâmico:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + (K_D + K_S)[Ligante]) + K_D K_S [Ligante]^2 \text{ (Eq. 12)}$$

Com a linearização da equação 12 é possível obter o produto de $K_S K_D$ com a inclinação, e $K_D + K_S$ pelo intercepto de y, sendo factível a identificação dos valores das constantes de forma isolada com a equação 13 (GADOMSKA *et al.*, 2021):

$$\left(\frac{F}{F_0} - 1\right) \frac{1}{[ligante]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [ligante] \text{ (Eq. 13)}$$

ii. Desvio negativo

Os casos em que ocorre o desvio da reta para a formação de uma curvatura para baixo é motivado, dentre outras causas, pela inacessibilidade de um fluoróforo, ou seja, o supressor consegue interagir fracionadamente com a molécula suprimida. Isso ocorre quando uma molécula possui mais de um fluoróforo disponível para interação, e o supressor tem acesso à apenas uma parte destes. Para mensurar a fração acessível ao fluoróforo, é utilizada a equação de Stern-Volmer modificada (Eq. 14):

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f} + \frac{1}{f K_{SV} [ligante]} \quad (\text{Eq. 14})$$

Onde f é a fração acessível ao fluoróforo. Também podem ocorrer eventos diversos que levam ao desvio negativo da inclinação de Stern-Volmer, como por exemplo, a emissão induzida por agregação, que ocorre em agregados de fluoróforos e resultam na redução da intensidade de fluorescência, além da auto-supressão de fluoróforos quando estes se encontram em altas concentrações (GEHLEN, 2020).

Outro fator que pode interferir na análise do gráfico de Stern-Volmer é o efeito filtro interno, que ocorre quando uma substância supressora absorve energia na região de emissão de um fluoróforo, levando a uma diminuição na intensidade de fluorescência emitida. Tendo em mente que a absorção deve aumentar de acordo com o aumento de concentração do supressor, deduz-se que este evento interfere nos reais valores de K_{SV} . Para correção deste efeito, é comumente utilizada a equação 15:

$$F_{corr} = F_{obs} 10^{\frac{(A_1 + A_2)}{2}} \quad (\text{Eq.15})$$

Onde F_{corr} e F_{obs} são a intensidade de fluorescência corrigida e a observada, respectivamente, e A_1 e A_2 são a absorbância do supressor no comprimento de onda de excitação e emissão, respectivamente. Além da equação de Stern-Volmer, existem outras maneiras de se obter parâmetros de interação biomolécula-ligante. A equação de equação de duplo logarítmico (Equação 16) torna possível a avaliação da constante de afinidade (K_b) e o número de sítios (n) em que um supressor se liga no fluoróforo:

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log K_b + n \log [Ligante] \quad (\text{Eq. 16})$$

Onde n é calculado pelo coeficiente angular e K_b pelo coeficiente linear. Tendo conhecimento de K_b , se torna possível o cálculo de parâmetros

termodinâmicos. Em temperaturas variadas, a plotagem do gráfico de Van't Hoff ($\ln K_b$ vs. $1/T$) elucida os valores de entalpia (ΔH°), entropia (ΔS°) e energia livre de gibbs (ΔG°) a partir da combinação das equações 17 e 18:

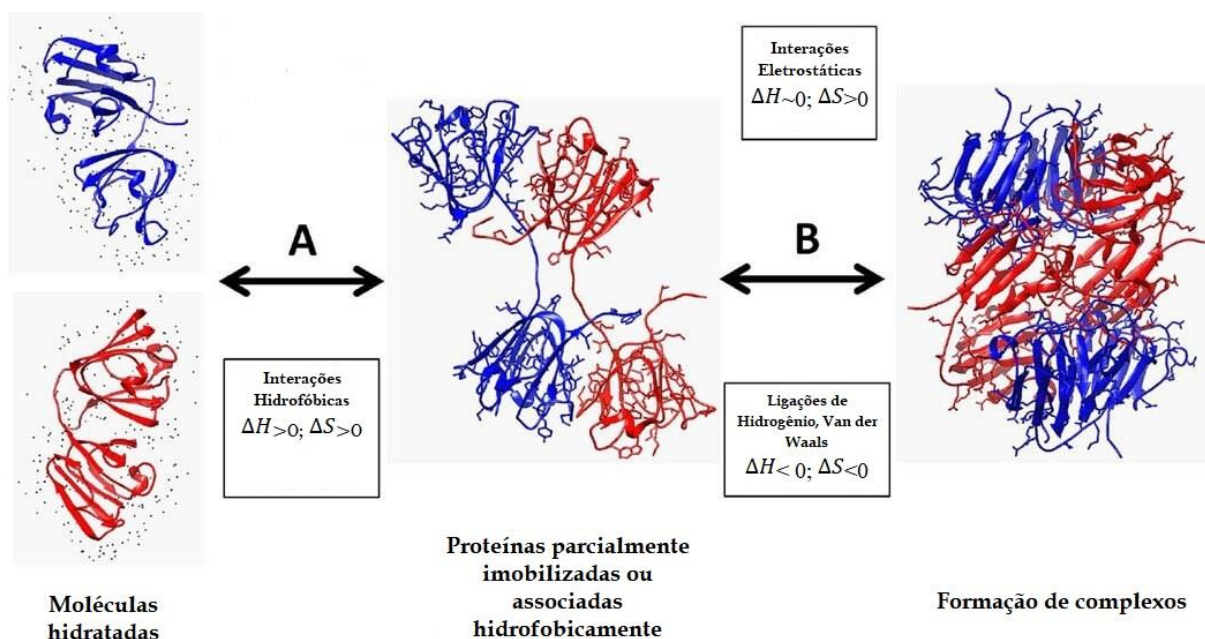
$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - \Delta S^\circ \cdot T \quad (\text{Eq. 17})$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (\text{Eq. 18})$$

De acordo com Ross e Subramanian (1981), os parâmetros termodinâmicos são úteis para a compreensão das forças de interação não-covalentes envolvidas no sistema fluoróforo-ligante. A representação das interações intermoleculares de biomoléculas e suas tendências termodinâmicas são expostas na figura 14. Quando há a presença de interações hidrofóbicas, temos o comportamento termodinâmico onde $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$. Este padrão ocorre devido ao processo que atua durante a formação de interações hidrofóbicas: com a introdução de uma substância não polar em meio aquoso, há a quebra de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água para a acomodação dos grupos hidrófobos. A quebra dessa ligação adiciona calor ao sistema, justificando a natureza endotérmica de tais interações. Por consequência, a interação entre grupos não polares se traduz na dessolvatação das moléculas de água que circundam as substâncias em solução aquosa, situação que propicia o aumento de entropia do sistema.

Se $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ as interações ocorrem preferencialmente por forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio, considerando a característica exotérmica do evento de solvatação de substâncias em meio aquoso decorrente destas forças. Adicionalmente, o processo de solvatação resulta na diminuição de graus de liberdade das moléculas de água, tornando o sistema mais ordenado, situação que reduz a entropia de forma significativa. Por outro lado, se $\Delta H < 0$ ou próximo de 0 e $\Delta S > 0$ há a presença de forças eletrostáticas, tendo em vista o aumento de entropia e a natureza entálpica de interações derivadas de espécies carregadas.

Figura 14 - Variação dos parâmetros termodinâmicos com relação às variadas interações entre biomacromoléculas



Fonte: Adaptado de <https://www.creative-biostructure.com/protein-thermodynamics-analysis-545.html>.

1.9.2 Fluorescência síncrona

Uma forma de se detalhar as interações proteína-ligante é por meio da investigação do que se sucede nos microambientes vizinhos aos resíduos de aminoácidos fluoróforos. A espectroscopia de fluorescência síncrona é uma interessante maneira de avaliar estas regiões, onde é possível adquirir as interações dos resíduos de triptofano e tirosina de forma individual. As alterações nos ambientes próximos aos resíduos de aminoácidos são monitoradas pelos deslocamentos no comprimento de onda de emissão máxima, fato que corresponde a mudanças na polaridade da proteína. Essas alterações são observadas fazendo uma varredura com os monocromadores de excitação e emissão no modo síncrono, onde o intervalo de comprimento de onda ($\Delta\lambda$) se faz constante. Para os resíduos de tirosina $\Delta\lambda=15$ nm e para os resíduos de triptofano $\Delta\lambda=60$ nm (ALMUTAIRI *et al.*, 2020).

No caso de não se notar deslocamento algum nos espectros de fluorescência síncrona, se denota ausência de mudanças no microambiente do

resíduo de aminoácido analisado. Deslocamentos batocrômicos, que consistem no deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ para regiões de menor energia (deslocamento para o vermelho) indicam o aumento de polaridade ao redor dos resíduos de aminoácidos aromáticos. Em contraste, deslocamentos hipsocrômicos, que são caracterizados pela alteração de $\lambda_{\text{máx}}$ para regiões de maior energia (deslocamento para azul), são resultantes do aumento da hidrofobicidade nas redondezas dos resíduos de aminoácidos. Adicionalmente, modificações na hidrofobicidade de proteínas são claros indicativos do desenovelamento proteico, podendo-se assumir a perda da sua configuração funcional (SIDDIQUI *et al.*, 2019).

Também é possível mensurar qual resíduo de aminoácido está interagindo mais fortemente por meio da razão da supressão da fluorescência síncrona (RSFQ%):

$$RSFQ(\%) = \left(1 - \frac{F}{F_0}\right) \times 100 \quad (\text{Eq. 19})$$

Fazendo a comparação entre RSFQ% para as interações de $\Delta\lambda=15$ nm e $\Delta\lambda=60$ nm, tem-se ideia do provável sítio de ligação da amostra na proteína, pois tal parâmetro demonstrará a proximidade do ligante em relação aos resíduos de Trp e Tyr.

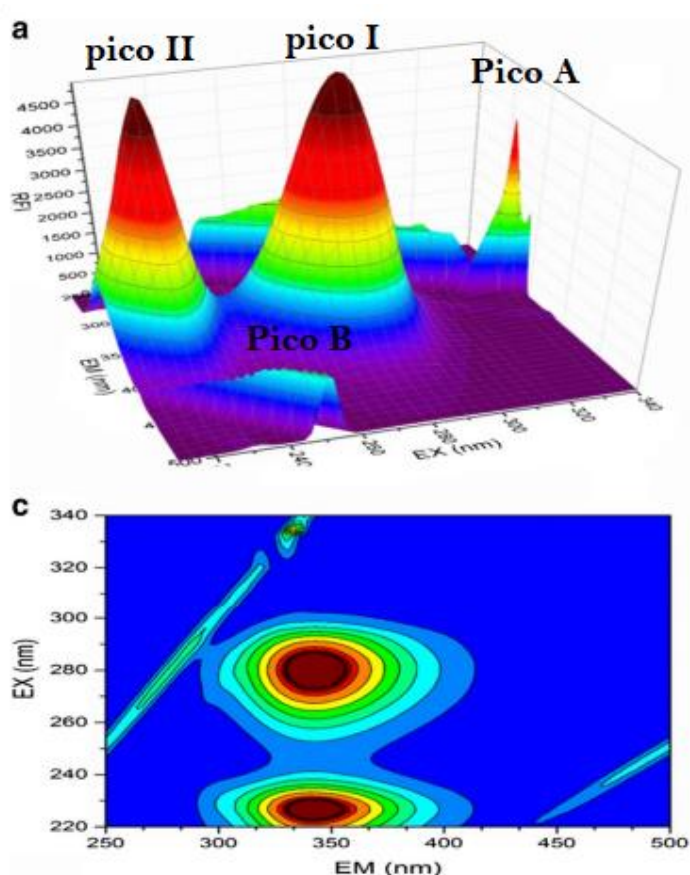
1.9.3 Fluorescência tridimensional

Também conhecida como espectroscopia em matriz excitação-emissão, a fluorescência 3D realiza uma análise multicomponente, resultado num gráfico que relaciona comprimento de onda de excitação, comprimento de onda de emissão e intensidade de fluorescência. Atualmente, esta técnica vem sendo amplamente utilizada para elucidar o mecanismo de interação de biomacromoléculas-ligantes, com a finalidade de monitorar alterações no microambiente dos fluoróforos, de maneira similar à fluorescência síncrona.

A análise dos espectros de fluorescência 3D de proteínas é realizada observando dois picos principais: o pico I que pode ser visualizado em $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/340$ corresponde aos resíduos de aminoácidos fluoróforos, onde sua mudança evidencia alterações na região circundante a Trp e Tyr. O pico II ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 230/340$) é motivo de discussão entre os pesquisadores da área de físico-química de macromoléculas, tendo em vista que grande parte da literatura científica atribui este pico à cadeia principal polipeptídica da proteína, deduzindo-se desta maneira que qualquer alteração deste pico com a adição de um ligante é derivada de uma mudança conformacional proteica. Por outro lado, (BORTOLOTTI *et al.*, 2016) descreveu que este pico não se deve à cadeia principal e nem à estrutura secundária da proteína, mas sim à excitação de um estado excitado mais alto pertencente aos resíduos aromáticos.

Adicionalmente, existem outros dois picos, um pertencente ao espalhamento Rayleigh onde $\lambda_{ex}=\lambda_{em}$ (Pico A), e outro relativo ao espalhamento de segunda ordem onde $\lambda_{ex}=2\lambda_{em}$ (Pico B) (LAKOWICZ, 2013). Com o intuito de aprimorar a análise do espectro tridimensional, podem ser obtidos mapas de contorno, possibilitando uma visão bidimensional dos espectros a partir de uma visão aérea. O mapa de contorno facilita a inspeção qualitativa da redução de intensidade de fluorescência da biomolécula. Para fins de exemplificação, foi representado na figura 15 o espectro 3D da albumina sérica bovina e seu mapa de contorno, sendo possível avistar os picos mencionados neste tópico.

Figura 15 – Espectros de fluorescência tridimensional e mapas de contorno da albumina sérica bovina medidos a 298 K e $[BSA] = 1.5 \mu\text{M}$.



Fonte: Adaptado de (WANI *et al.*, 2017).

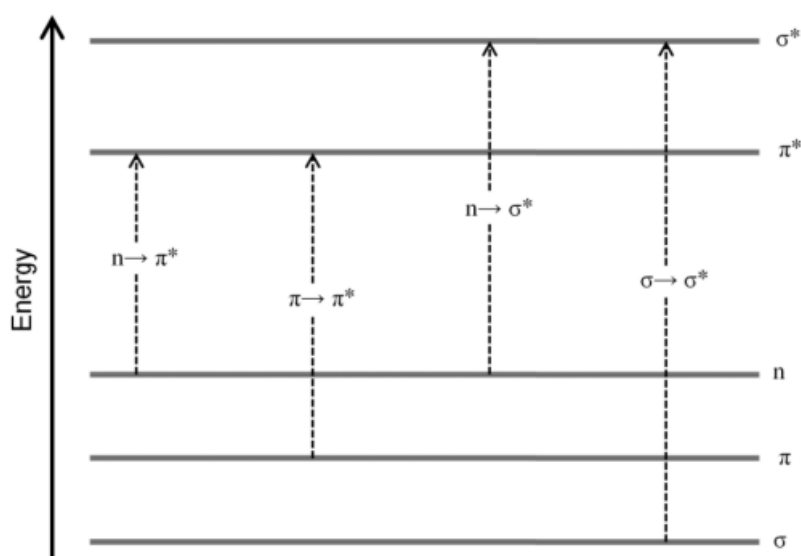
1.9.4 UV-Vis

A espectroscopia na região do ultravioleta (entre 200 e 400 nm) e visível (de 400 a 800 nm) é uma ferramenta capaz de detectar a absorção de fótons de amostras contendo grupos cromóforos. Esta absorção de energia se deve às transições de elétrons dos cromóforos do estado fundamental para o estado excitado. A partir dessas transições, é possível obter padrões diversos para cada substância.

As transições eletrônicas que originam o espectro de UV-Vis dependem da estrutura química da substância analisada e variam de energia conforme a figura 16. Como notado, as transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ são de alta energia e por isso são

detectados numa região abaixo de 150 nm. As transições $n \rightarrow \sigma^*$ ocorrem quando a amostra apresenta pares de elétrons não ligantes, como compostos orgânicos contendo heteroátomos e são avistados no espectro entre 150 e 250 nm. Já as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ são mais facilmente detectadas na espectroscopia UV-Vis e correspondem a variados grupos cromóforos, como anéis aromáticos, carbonilas, amidas, entre outros. As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ podem ser vistas nas regiões entre 150 e 250 nm, enquanto as transições $n \rightarrow \pi^*$ são observadas numa faixa mais ampla, entre 200 e 700 nm.

Figura 16 – Representação dos níveis de energia de orbitais moleculares e suas respectivas transições eletrônicas



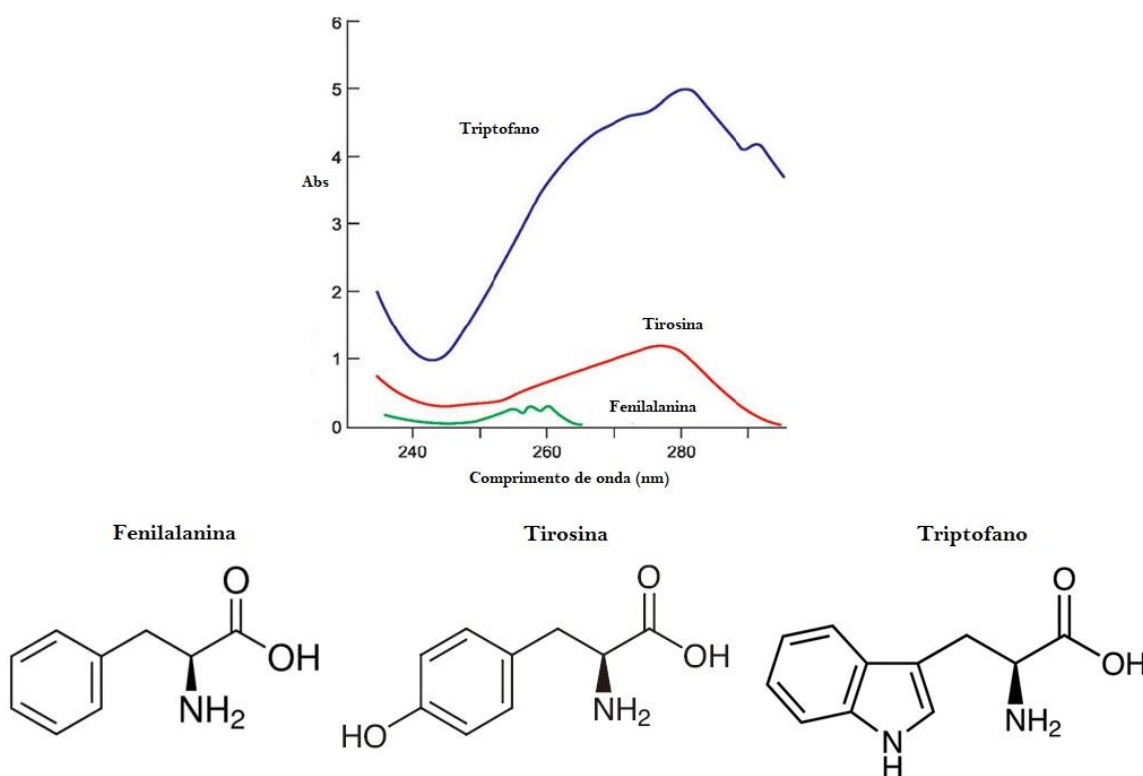
Fonte: <https://archive.nptel.ac.in/content/storage2/courses/102103047/PDF/mod2.pdf>

No tocante à análise de proteínas, é concebível a identificação da ligação amida presente na estrutura proteica, isto é, na ligação peptídica, que absorve energia na região do UV distante, entre 180 e 230 nm. Neste caso, ocorrem as transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ em 195 nm e $n \rightarrow \pi^*$ entre 210 e 220 nm (PIGNATARO; HERRERA; DODERO, 2020). Usualmente, em estudos de interação proteína-ligante, quando se observam alterações no espectro UV-Vis na

região mencionada previamente, se infere a modificação conformacional proteica induzida por um ligante, tendo em vista que as ligações amida compõem a cadeia principal da proteína (SIDDIQUI *et al.*, 2021).

Na região do UV próximo (de 240 a 295 nm) são detectadas as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos resíduos de aminoácidos que contém anéis aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano (LUCAS *et al.*, 2006). Cada resíduo de aminoácido contribui para o espectro de UV-Vis de forma desproporcional, como demonstrado na figura 17. O triptofano possui a maior intensidade de absorção atribuído à presença do grupo indol em sua estrutura química, com pico máximo em 280 nm, sobrepondo-se aos demais. A tirosina apresenta menor intensidade se comparado com o triptofano, com $\lambda_{\text{máx}} = 276$ nm, enquanto a fenilalanina demonstra menor intensidade de absorção com pico máximo em torno de 260 nm.

Figura 17 – Espectros de absorção na região UV-Vis dos resíduos de aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina e suas estruturas químicas.



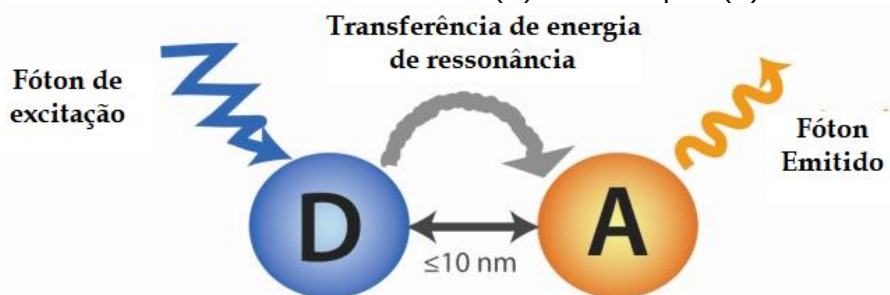
Fonte: Adaptado de (PERUMCHERIL, 2015)

Em relação à estudos de interação entre proteínas e ligantes, geralmente se monitora a alteração na absorção do pico principal em 280 nm de acordo com a sucessiva adição de ligante. Mudanças neste pico revelam perturbações no microambiente onde se encontram tais resíduos de aminoácidos. Também há a possibilidade de haverem deslocamentos do pico de máxima intensidade de absorção, sendo avaliados do mesmo modo que os deslocamentos da fluorescência síncrona.

1.9.5 Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET)

Tendo em vista que interações proteína-ligante podem também resultar em processos de transferência de energia, se torna necessário o estudo da técnica de Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET). Esta técnica é caracterizada como um processo não-radiativo que ocorre através da transferência de energia entre um fluóforo doador e um fluóforo receptor localizados próximos um do outro. Para que haja o processo de FRET entre moléculas, é preciso que a distância entre estas esteja na faixa de 0.5 nm - 10 nm, que haja a sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do aceptor e uma adequada orientação dos seus dipolos de transição (CLEGG, 2009; PRASAD; ZEUG; PONIMASKIN, 2013; SANNAIKAR; INAMDAR; INAMDAR, 2019). A Figura 18 representa o processo decorrido da transferência de energia de ressonância de Förster.

Figura 18 - Representação do processo de transferência de energia de ressonância de Förster entre um doador (D) e um aceptor (A).



Fonte: Adaptado de ŠIMKOVÁ; STANĚK, 2012

Este processo pode ser identificado experimentalmente através de alterações nos tempos de vida do sistema aceptor-fluóforo em comparação com

o tempo de vida do doador livre, bem como com a sobreposição do espectro de emissão do fluóforo doador (proteína) e o espectro de absorção do fluóforo acceptor (ligante). A eficiência do FRET (E_{FRET}) é inversamente proporcional à distância entre as moléculas (r), e é calculada pela equação 20:

$$E_{FRET} = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6} \text{ (Eq. 20)}$$

Onde R_0 é a distância Foster a qual a eficiência do FRET atinge o valor de 50%. O valor de R_0 é obtido pela equação 21:

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi J \text{ (Eq. 21)}$$

K é o fator especial do dipolo, n é o índice de refração do meio, Φ é o rendimento quântico da fluorescência do doador J é a integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador com o espectro de absorção do acceptor. o valor de J é obtido pela equação 22:

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d(\lambda)}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \text{ (Eq. 22)}$$

O estudo do FRET é frequentemente aplicado para se obter informações sobre interações intermoleculares, justaposições espaciais e a distribuição de supramacromoléculas e substâncias que integram o meio biológico, permitindo a compreensão destes ambientes na escala molecular. Por conseguinte, é possível determinar a distância entre os resíduos de aminoácidos fluoróforos de proteínas (molécula doadora) e os supressores de fluorescência (moléculas acceptoras), permitindo-se a extração de informações adicionais sobre a posição do ligante em relação à estrutura proteica.

2 ESTUDOS DE INTERAÇÃO E INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE PELAS DROGAS LAPATINIBE E PAZOPANIBE

2.1 Introdução e objetivos

A enzima acetilcolinesterase (AChE) apresenta papel único na sinalização neuronal, tendo em vista sua função catalítica, atuante no neurotransmissor acetilcolina (ACh). Esta enzima faz uso do substrato ACh hidrolisando-o, onde a deficiência desta substância consequentemente interrompe a transmissão de impulsos nervosos no cérebro (POHANKA, 2012). Apesar da sua importância em funções colinérgicas, a AChE também atua com funcionalidades divergentes da ação enzimática, tais como influências na diferenciação, proliferação e adesão celular (LAZAREVIC-PASTI *et al.*, 2017), na deposição da proteína amiloide em órgãos (INESTROSA; DINAMARCA; ALVAREZ, 2008), na apoptose (XI *et al.*, 2015) e na formação de tumores (RUIZ-ESPEJO *et al.*, 2002).

No tocante à tumorigênese, em diversos tipos de células cancerígenas são relatadas expressões anormais da AChE, bem como modificações estruturais desta enzima. Além disso, a amplificação de genes relacionados ao grupos das colinesterases em determinados tipos células de câncer reforça a participação da AChE em tumores malignos (MONTENEGRO *et al.*, 2006; SYED *et al.*, 2008). No câncer de mama estes fatos previamente mencionados também são recorrentes (BERNARDI *et al.*, 2010; RUIZ-ESPEJO *et al.*, 2002; VIDAL, 2005), até mesmo em casos onde há a metástase (RUIZ-ESPEJO *et al.*, 2003).

Compostos inibidores da enzima tirosina quinase têm trazido resultados eficazes na inibição da AChE (HUANG *et al.*, 2016; JAVIDNIA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2015), reverberando a possibilidade da descoberta de potenciais drogas multi-alvo passíveis de reposicionamento.

São crescentes as pesquisas relacionadas à descoberta de drogas multi-alvo, tanto na área de design e desenvolvimento, quanto na compreensão do mecanismo molecular envolvido no efeito terapêutico (APAYDIN; TÖRÖK, 2019;

BROEKMAN; GIOVANNETTI; PETERS, 2011). Uma série de medicamentos antitumorais com vários alvos moleculares apresentam poder de inibição da AChE (JOŃCZYK *et al.*, 2020), destacando a relação entre o câncer e tal enzima (GARCIA-RATÉS; GREENFIELD, 2017).

Em um estudo teórico, foram identificadas 13 drogas dos ITQs analisados que possuem alta probabilidade de inibir a AChE. O medicamento Pazopanibe, originalmente direcionado para o tratamento de câncer de mama, foi verificado como melhor droga para inibição da AChE dentre os 13 ITQs estudados, fato comprovado também através de triagem experimental de inibição (YANG *et al.*, 2015).

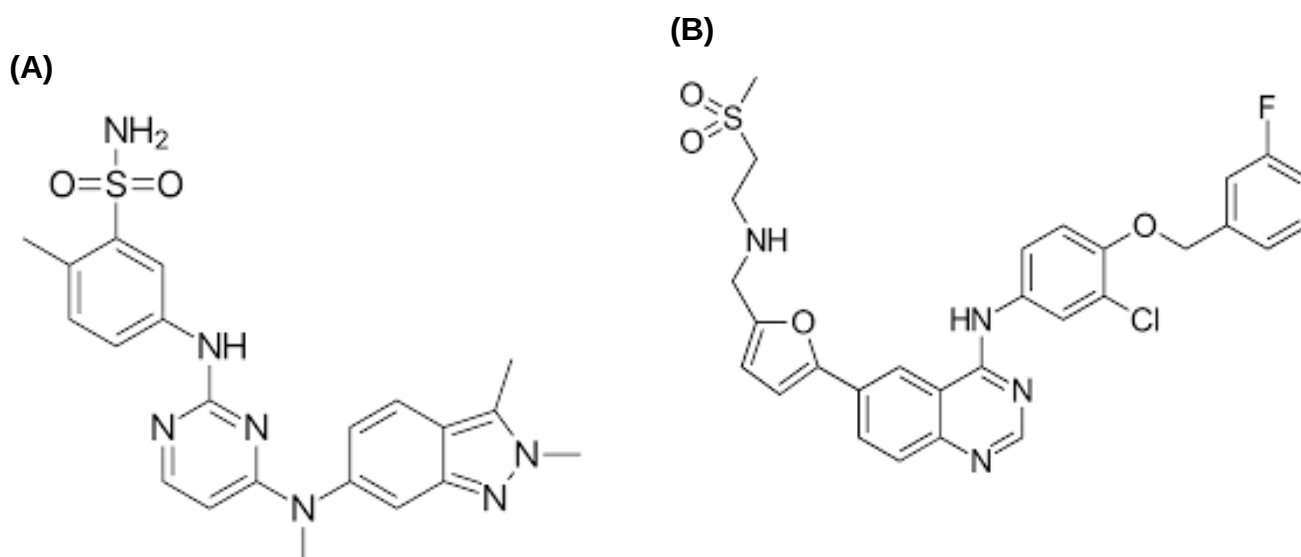
O fármaco lapatinibe, integrante do grupo dos ITQ, foi primordialmente arquitetado como droga multi-alvo para tratamento tumoral, mostrando dual interação com receptores biológicos voltados para o câncer de mama (ZHOU *et al.*, 2019). Além disso, lapatinibe e pazopanibe possuem a capacidade de permear a barreira hematoencefálica, permitindo o seu uso em terapias de metástase a nível cerebral em pacientes com câncer de mama (GRIL *et al.*, 2013; SALEEM *et al.*, 2015), trazendo a possibilidade do reposicionamento destes fármacos ao tratamento de desordens neurodegenerativas (GAGALO; RUSIECKA; KOCIC, 2015).

Apesar de estudos sobre a Doença de Alzheimer apresentarem grande quantidade de proteínas como alvos moleculares terapêuticos, os medicamentos atualmente aprovados pelas agências de controle para a DA foram desenvolvidos majoritariamente com foco na inibição da AChE (POHANKA, 2012). Nos dias atuais, existem apenas cinco medicamentos aprovados para o tratamento da DA e 121 em fase de testes clínicos, sendo dentre estes 52 fármacos reposicionados (SABBAGH, 2020). Dentre os fármacos selecionados para testes clínicos, dois deles são inibidores da tirosina quinase: o dasatinib, verificado como potente inibidor da agregação da proteína tau, e o nilotinib, que atua eliminando as proteínas β -amilóide e tau (CUMMINGS *et al.*, 2022).

Recentemente foi aprovado o medicamento aducanumabe para o tratamento da DA, considerando como alvo molecular a inibição de fibrilas β -amilóide (ALI; GUPTA; CHAWLA, 2022). Entretanto, tal fármaco se mostra uma opção inviável financeiramente, tendo em vista que o mesmo contém em sua composição anticorpos monoclonais, tecnologia de alto custo devido à dificuldade de obtenção de tais biomoléculas.

Desta forma, com o intuito de avaliar o potencial de reposicionamento dos ITQ pazopanibe (Figura 19(A)) e lapatinibe (Figura 19(B)) para tratamento da DA, e compreender detalhadamente o comportamento das interações intermoleculares envolvidas no contato entre a AChE e as drogas, foram realizados estudos espectroscópicos para avaliar a afinidade, o padrão de inibição e de ligação proteína-ligante e alterações conformacionais da enzima diante da interação aqui estudada.

Figura 19 - Estrutura química dos fármacos Pazopanibe (A) e Lapatinibe (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Reagentes

Nos experimentos descritos nesse capítulo foram utilizados água deionizada e apenas reagentes e solventes de pureza analítica. As drogas lapatinibe e pazopanibe, a acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus*, o iodeto de acetiltiocolina e o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) foram obtidos pela Sigma-Aldrich (EUA) e foram utilizados sem purificação prévia.

2.2.2 Metodologia

2.2.2.1 Obtenção dos extratos de acetilcolinesterase

Foram obtidos extratos da AChE a partir de olhos de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* e de brânquias de ostras do mangue da espécie *Crassostrea rhizophorae*, seguindo a literatura (DE SOUZA et al., 2018). Foram homogeneizados 20 mg de tecido/mL em tampão Tris-HCl a 0.5 mmol.L⁻¹ (pH 8) e centrifugados a 10,000 x g a 4° C durante 10 minutos. Os extratos foram obtidos a partir do sobrenadante separado na centrifugação e armazenado sob refrigeração a -20°C até a utilização para as análises. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford modificado (SEDMAN; GROSSBERG, 1977). O método de Bradford modificado consiste no uso do corante azul brilhante de comassie, utilizando uma proteína padrão como a albumina sérica bovina (BSA). O corante mencionado interage com a cadeia polipeptídica proteica, alterando seu pico de absorção de 465 para 595 nm, gerando diferentes intensidades de absorbância de acordo com a concentração da proteína. A concentração da proteína é mensurada com a elaboração de uma curva padrão com a BSA e obtenção da equação linear de 1º grau para a mesma, estimando-se a concentração em 0.23 mg/mL de proteínas no extrato da *Litopenaeus vannamei* e 1.22 mg/mL no extrato da *Crassostrea rhizophorae*.

2.2.2.2 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase

A inibição da acetilcolinesterase foi realizada no Laboratório de Enzimologia (LABENZ) da UFPE. Tal estudo foi realizado com a AChE comercial *Electrophorus electricus*, e com os extratos obtidos da *Litopenaeus vannamei* e *Crassostrea rhizophorae* através do método de Ellman com modificações (ARAÚJO *et al.*, 2018). As soluções das drogas estudadas foram diluídas seriadamente com concentrações variando entre 0 e 300 μM . Numa placa de 96 poços foram incubados 10 μL dos compostos em variadas concentrações com 10 μL da enzima (1 $\mu\text{g/mL}$) a 298 K durante 1 hora. Após esse tempo, foram adicionados 200 μL de DTNB (0.25 mM) e 20 μL do substrato iodato de acetiltiocolina (62 mM) foi acrescentado em cada poço da placa para o registro da absorbância em 405 nm, com o intuito de identificar o monitoramento do produto formado da reação entre a DTNB e o substrato utilizado. A absorbância foi registrada entre 0 e 180 segundos. A atividade específica da enzima (atividade da AChE por mg de proteína total – mU/mg) foi obtida através da equação 23:

$$\text{Atividade específica} = \frac{((A_1 - A_0)/t) \cdot FD}{\epsilon \cdot [\text{proteína}]} \cdot 10^6 \quad (\text{Eq. 23})$$

Onde A_1 reflete a absorbância medida das amostras e A_0 é a absorbância do branco, FD é o fator de diluição, ϵ é o coeficiente de extinção molar do produto da reação DTNB-Substrato ($13.600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), e $[\text{proteína}]$ é a concentração de AChE utilizada na reação. Os percentuais de inibição enzimática foram obtidos a partir da equação 24:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{EA_1}{EA_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 24})$$

Onde o EA_1 é a atividade específica das amostras e EA_0 é a atividade específica do branco das soluções analisadas. Sendo assim, foram calculadas as concentrações onde há a inibição de 50% da enzima (IC_{50}) através do software Graphpad Prism 8.0.

2.2.2.3 Estudo do tipo de inibição entre os fármacos e a AChE

A análise do tipo de cinética enzimática foi avaliada pela plotagem do gráfico de Lineweaver-Burk, realizada através da curva de Michaelis-Menten (LINEWEAVER; BURK, 1934). Para desempenhar o experimento, variaram-se as concentrações do substrato (0,83 a 20,83 mM) nas concentrações das drogas entre 0 e 300 μ M. Os experimentos foram realizados com a acetilcolinesterase comercial de forma quadruplicada.

2.2.2.4 Medidas de fluorescência no estado estacionário

Os estudos supressão de fluorescência foram mensurados num espectrofluorímetro de marca Jasco, modelo FP-6300 acoplado a um banho termostatizado. Os espectros foram medidos com excitação em 280 nm e largura de fenda de excitação/emissão de 5 nm. Os espectros de emissão foram registrados com intervalo de varredura entre 280 e 400 nm utilizando-se uma cubeta de quartzo, onde foram adicionados 3 mL de solução de acetilcolinesterase (0,1 μ g/mL) e neste recipiente foi titulado o fármaco lapatinibe a concentrações crescentes de 0 e 1,3 μ M. Para análise das interações da AChE com o fármaco pazopanibe foi adotado o mesmo procedimento. Os experimentos foram realizados em 296, 306 e 310 K. Para o cálculo dos parâmetros que evidenciam o mecanismo de ligação das interações entre a acetilcolinesterase e os fármacos foram utilizados o gráfico de Stern-Volmer (Eq. 10), e o gráfico de duplo logarítmo (Eq. 16). Adicionalmente, as propriedades termodinâmicas das interações aqui analisadas são obtidas através do gráfico de Van't Hoff (Eq. 17 e 18).

2.2.2.5 Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET)

As medidas foram realizadas num espectrofluorímetro de marca Jasco, modelo FP-6300, e num espectrofotômetro modelo Lambda, marca Perkin Elmer (EUA), usando uma cubeta com 1 cm de caminho óptico. A FRET foi mensurada a partir da sobreposição dos espectros de absorção dos fármacos (pazopanibe e lapatinibe) e o espectro de emissão de fluorescência da AChE com concentrações

na proporção 1:1. Além disso, foi registrado o espectro de emissão de fluorescência da mistura droga-AChE nesta mesma proporção. O comprimento de onda de excitação da enzima foi de 280 nm e os espectros foram registrados entre 280 e 450 nm.

2.2.2.6 Estudo de fluorescência tridimensional

A espectroscopia de fluorescência tridimensional mostra informações acerca das alterações conformacionais específicas da proteína utilizada nos experimentos. Portanto foram medidos o espectro de fluorescência 3D da AChE na ausência dos fármacos lapatinibe e pazopanibe e na presença das drogas na proporção de 1:1. Os espectros de emissão e excitação foram registrados em comprimentos de onda entre 220 e 400 nm, com incremento de 10 nm.

2.2.2.7 Estudo de fluorescência síncrona

A fluorescência síncrona foi realizada com base na variação simultânea dos monocromadores de excitação e emissão, fixando-se uma diferença de comprimento de onda ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). Desta forma, é possível tornar a técnica mais sensível às mudanças no microambiente ao redor dos resíduos de aminoácidos Triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) e Tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) da AChE enquanto a mesma interage com os fármacos. A concentração utilizada para a enzima foi de $1,19 \text{ nmol.L}^{-1}$, e a concentração dos fármacos variou de 0 a $5,95 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, com largura de fenda de excitação/emissão de 5 nm.

2.2.2.8 Estudo teórico

Os estudos *in silico* foram realizados em colaboração com o professor Gustavo Miranda Seabra, vinculado ao Departamento de Química Medicinal da Universidade da Flórida (EUA). O procedimento utilizado foi detalhado a seguir.

Como estrutura inicial para análise das interações enzima-fármacos, foi utilizada a AChE da espécie *Tetronarce californica* (PDBID: 6EUC) por ser

homóloga à AChE oriunda da *Electrophorus electricus* (MARTINS *et al.*, 2021) usada nos experimentos de inibição e interação. Complementarmente, foram analisados o comportamento das interações com a presença do substrato acetilcolina (ATC), inserindo-o no sítio de ligação por ancoragem molecular com o programa Autodock Vina 4.2 (TROTT; OLSON, 2010).

Os parâmetros para ATC foram obtidos com Antechamber usando cargas GAFF2 e AM1-BCC. Os complexos (com ou sem ATC) foram solvatados com uma caixa octaédrica e modelo de água OPC, com um preenchimento de 10 Å entre a proteína e os lados da caixa. Os sistemas foram inicialmente submetidos a 100 etapas de minimização de energia onde apenas o solvente podia se mover, seguido de 10.000 etapas de minimização permitindo que todo o sistema se movesse. Em seguida, eles foram aquecidos lentamente de 0 K a 310 K por 600 ps a volume constante e deixados em repouso nessa temperatura final por 400 ps. Em seguida, os sistemas foram deixados para relaxar a pressão e temperatura constantes por 2 ns, seguido por 200 ns de fase de produção MD nas mesmas condições. As minimizações utilizaram o programa SANDER, e as simulações MD utilizaram a versão CUDA do software PMEMD (GOTZ *et al.*, 2012; LE GRAND; GÖTZ; WALKER, 2013; SALOMON-FERRER *et al.*, 2013), ambos parte do pacote de simulação AMBER20 (CASE *et al.*, 2020). As trajetórias resultantes foram agrupadas em 30 clusters diferentes usando CPPTRAJ (também distribuído com AMBER 20) com o esquema hierárquico-aglomerativo usando como referência todos os resíduos dentro de 15 Å do substrato na estrutura original, e uma estrutura representativa de cada cluster tomada para uso na atracação de Lapatinibe e Pazopanibe, como forma de considerar a flexibilidade alvo nas ancoragens (MEIRA MENEZES *et al.*, 2021).

Para a AChE na presença de ATC, o procedimento de ancoragem molecular foi realizado em duas etapas. Primeiro, para detectar possíveis sítios de ligação, foi usada a técnica de ancoragem às cegas com QVina-W (HASSAN *et al.*, 2017) para encaixar os ligantes em cada estrutura representativa do complexo AChE-ATC, usando uma caixa de grade centrada no alvo e grande o suficiente para abranger toda a proteína (tamanho lateral - 70 Å). Foram realizados 10

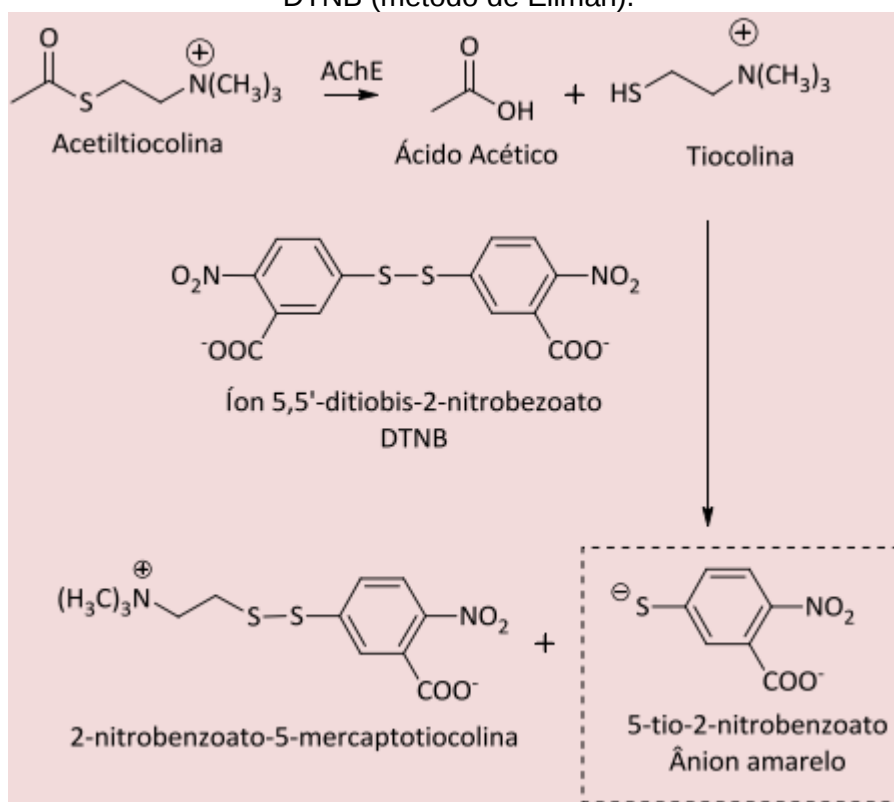
experimentos de ancoragem para cada combinação de ligante-alvo molecular, armazenando até 5 posições dentro de uma faixa de energia de 3,0 kcal.mol⁻¹ da posição de classificação mais alta. As posições dos ligantes obtidas foram agrupadas para determinar os sítios de ligação, resultando em 7 sítios distintos, e o centro dos sítios foram determinados a partir da coordenada média das estruturas representativas de cada ligante. Em seguida, os ligantes foram ancorados em cada local em 10 repetições, usando QVina2 (ALHOSSARY *et al.*, 2015) com uma caixa de grade com 47,25 Å de lados e exaustividade no valor de 64, armazenando no máximo 5 posições dentro de 3,0 kcal/mol da posição de melhor classificação. Como as caixas de grade estavam sobrepostas, os resultados finais da ancoragem foram atribuídos a sítios específicos com base na distância de posição para cada sítio, ignorando a caixa de grade usada para o encaixe. Para a proteína sem ATC, consideramos os mesmos centros de sítio determinados para o sistema AChE-ATC, mas apenas ancoramos as moléculas nos dois sítios mais promissores localizados na modelagem anterior (MEIRA MENEZES *et al.*, 2021).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Atividade anticolinesterase dos fármacos

Os ensaios de inibição foram realizados com o intuito de analisar a performance enzimática da AChE quando a mesma interage com os fármacos estudados. A análise colorimétrica de Ellman permite a caracterização da reação enzima-substrato através do reagente adicional DTNB (Figura 20). A acetiltiocolina ao reagir com a AChE gera como produto o ácido acético e a tiocolina, entretanto tais produtos não absorvem energia na região UV-Vis, impedindo-os de serem detectáveis nos espectrofotômetros. Ao adicionar o DTNB, a tiocolina reage com o mesmo e forma o ácido 2-nitro-5-mercaptop-benzóico (TNB), um produto de cor amarela que absorve energia em 405 nm (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

Figura 20 - Reações de identificação da hidrólise da acetiltiocolina pela AChE através do DTNB (método de Ellman).

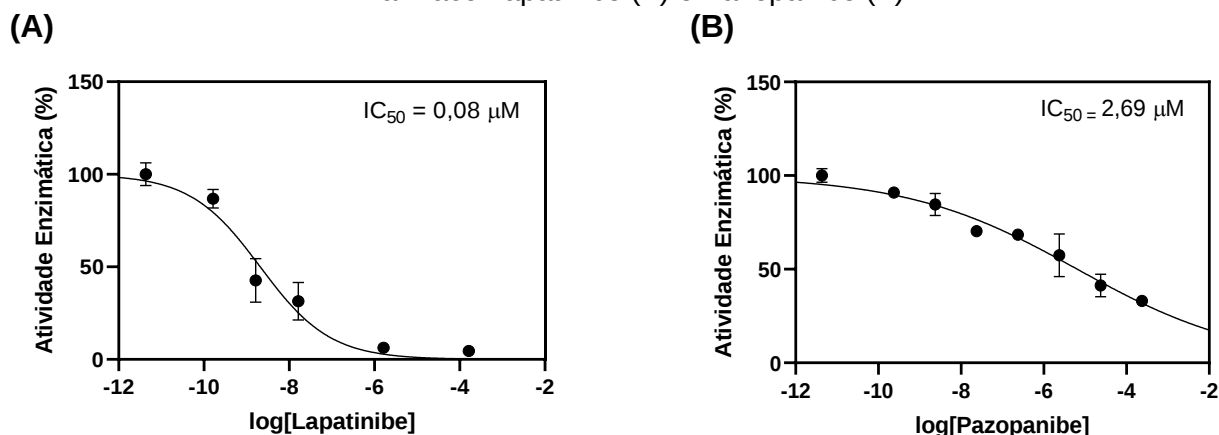


Fonte: (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

Nos estudos de inibição enzimática realizados, ao registrar a velocidade da enzima após o período de incubação com os fármacos em diversas concentrações, verificou-se que há a diminuição gradual da atividade enzimática de acordo com o aumento da concentração dos fármacos.

A Figura 21 representa a regressão não-linear da atividade enzimática diante da concentração dos potenciais inibidores, onde para a AChE da *Electrophorus Electricus* obteve-se o IC₅₀ de 0.08 µM para a lapatinibe e 2.69 µM no caso da pazopanibe. Comparando-se com alguns inibidores comerciais da AChE, o fármaco Lapatinibe é cerca de 5 vezes mais eficaz que a Tacrina e 8 vezes melhor que a Galantamina e 43 vezes melhor que a Rivastigmina (BASHA *et al.*, 2018).

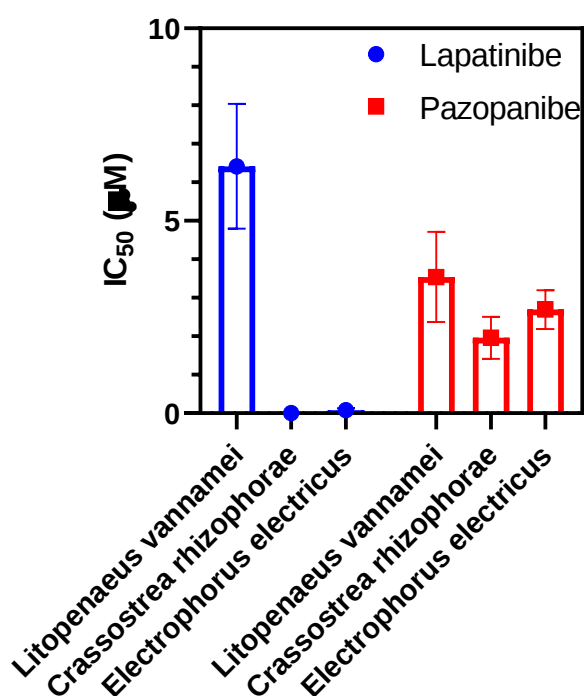
Figura 21- Curva de Inibição da Acetilcolinesterase através do contato da enzima com o fármaco Lapatinibe (A) e Pazopanibe (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

Extratos oriundos de tecidos de animais marinhos como os olhos de camarões e brânquias de ostras, podem ser utilizados satisfatoriamente como modelos para simular o ambiente biológico em relação à inibição da AChE, tendo em vista a abundância desta enzima nestes órgãos (DA SILVA BARBOSA *et al.*, 2020; DE SOUZA *et al.*, 2018; GARCÍA-DE LA PARRA *et al.*, 2006). A figura 22 mostra uma comparação dos valores de IC₅₀ para a inibição da AChE comercial e dos extratos da AChE oriundos da espécie *Crassostrea rhizophorae*. O IC₅₀ do sistema contendo a AChE da *Litopenaeus vannamei* mostram valores de 6.41 µM e 3.54 µM para a inibição com a lapatinibe e pazopanib, respectivamente. Para a AChE da *C. rhizophorae* observaram-se valores de 0.004 µM para a lapatinib e 1.96 µM para a pazopanib. No geral, os valores de IC₅₀ no extrato da AChE da *L. vannamei* se mostram suavemente mais elevados em relação à taxa de inibição da enzima comercial. Um importante motivo para isso seria possível distinção estrutural entre as enzimas, e além disso, os extratos possuem menor pureza se comparado com a enzima comercial.

Figura 22 - Valores de IC_{50} relativos à inibição da acetilcolinesterase extraídos das espécies *L. vannamei*, *C. rhizophorae* e *E. electricus* pelos fármacos lapatinibe (em azul) e pazopanibe (em vermelho).



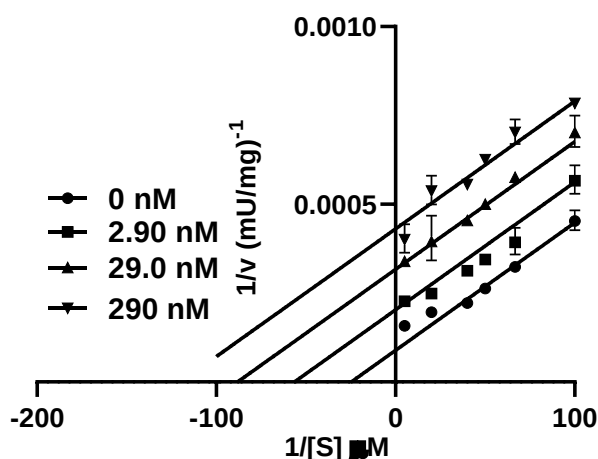
Fonte: Elaborado pela autora.

Em contraponto, os valores de IC_{50} da *C. rhizophorae* demonstram alta similaridade com a *E. electricus*. Os valores convergentes podem indicar possível homologia nas regiões próximas ao sítio ativo nas enzimas analisadas. Devido à ausência do sequenciamento das proteínas presentes nos extratos, não foi possível verificar tal hipótese na presente tese. Ademais, em função de se tratar de dois extratos de composição variada, e sendo possível a interação da AChE com outras biomoléculas presentes no extrato, as diferenças na fração efetiva de AChE disponível para interagir com o fármaco em cada um destes também pode ter sido um fator decisivo para as discrepâncias observadas nos resultados.

Apesar disso, em todos os tipos de extrato de AChE foram evidenciados valores de IC_{50} em ordens de grandeza igual ou menor que μM , fato que mostra a efetividade da inibição da AChE por parte dos fármacos estudados tanto em sistemas *in vitro* isolados, quanto em sistemas de maior complexidade como os extratos biológicos.

Para determinar o tipo de inibição que ocorre entre a AChE e os fármacos, foi analisada a cinética da enzima variando-se a concentração de substrato e a concentração de inibidor, sendo possível através disso elaborar o gráfico de Lineweaver-Burk. A Figura 23 mostra que o gráfico duplo-recíproco apresenta linhas paralelas em diferentes concentrações do fármaco que interceptam o eixo x e y em pontos distintos, possuindo perfil de inibição incompetitiva. Sendo assim, a droga lapatinibe possui afinidade pela enzima apenas no momento em que há a ligação do substrato com a AChE, e $V_{m\acute{a}x}'$ e K_m' diminuem concomitantemente de acordo com o aumento da concentração do inibidor.

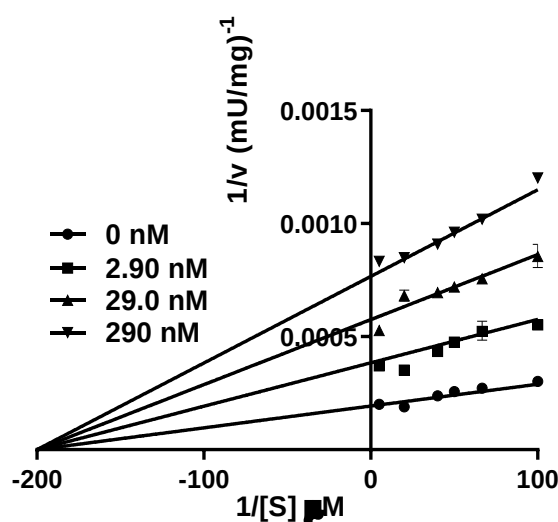
Figura 23 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de inibição da Acetilcolinesterase pelo fármaco Lapatinibe.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em contraponto, o duplo-recíproco da inibição da AChE com a pazopanibe na Figura 24 mostram linhas que interceptam o eixo x em um mesmo ponto e o eixo y em pontos divergentes, significando que a concentrações crescentes do fármaco o K_m' da enzima permanece inalterado e há a diminuição da $V_{m\acute{a}x}'$, caracterizando a inibição como não-competitiva, ou seja, a ligação do fármaco com a enzima ocorre em local diferente dos sítios ativos da AChE.

Figura 24 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o ensaio de inibição da Acetilcolinesterase pelo fármaco Pazopanibe.



Fonte: Elaborado pela autora.

Considerando-se que a lapatinibe é um inibidor acompetitivo, é correto afirmar que este medicamento é um potente inibidor da AChE, tendo em vista que sua inibição aumenta de forma concomitante com o acréscimo de substrato. Portanto, sua efetividade na ação anticolinesterásica é facilmente notada observando os valores de IC_{50} com o seu tipo de mecanismo de inibição.

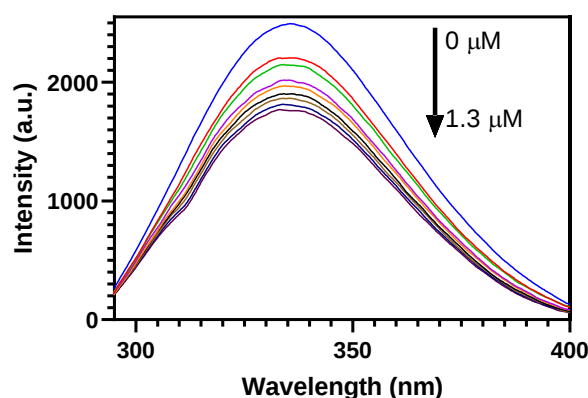
O tipo de inibição não-competitiva é recorrente para inibidores da acetilcolinesterase, tomando-se como exemplo as drogas Donepezil e a Tacrina (POHANKA, 2015). Em relação ao local de interação da enzima com o inibidor, é bastante comum que inibidores não-competitivos apresentem afinidade com o subsítio aniônico da AChE, sendo portanto um possível local de interação da pazopanibe com a enzima (KOSTELNIK; POHANKA, 2018).

2.3.2 Estudo de interação fármaco-AChE por supressão de fluorescência

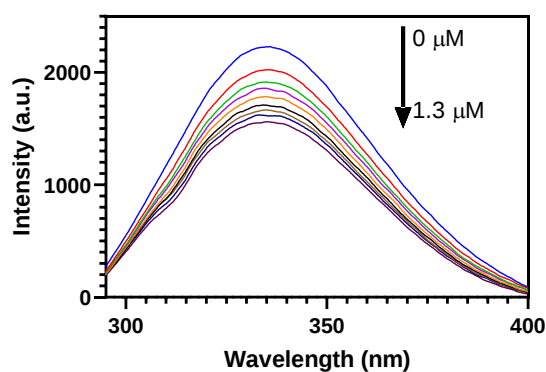
Os estudos de supressão de fluorescência no estado estacionário refletiram a sensibilidade da enzima ao interagir com os fármacos estudados. As curvas observadas nas Figuras 25 e 26 mostram as intensidades de fluorescência intrínsecas dos resíduos dos aminoácidos tirosina e triptofano presentes em todas as proteínas, e a diminuição das intensidades de acordo com a adição de sucessivas alíquotas dos fármacos.

Figura 25 - Espectros de emissão de fluorescência da AChE e sua supressão pela adição da Lapatinibe a 296 K (A), 306 K (B) e 316 K (C), com $\lambda_{exc} = 280$ nm. Solução de AChE em Tris-HCl 0,5 mM, pH 8.

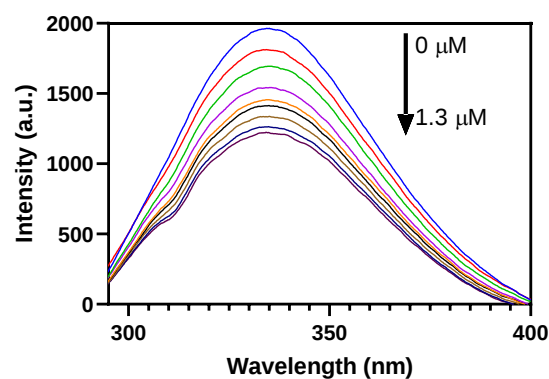
(A)



(B)



(C)

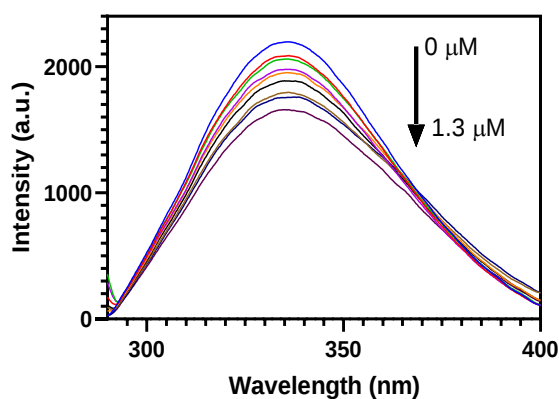


Fonte: Elaborado pela autora.

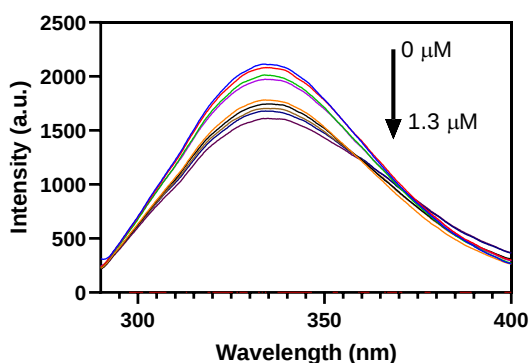
Modificações no comprimento de onda máximo de emissão evidenciam a mudança na polaridade do microambiente o qual se encontram os resíduos de aminoácidos responsáveis pela fluorescência, onde a 298 K a variação do $\lambda_{\text{máx}}$ comparando-se valores de intensidade de fluorescência com e sem a concentração máxima dos fármacos correspondem a 3 nm para a lapatinibe e 5 nm para a pazopanibe. Para melhor compreensão do microambiente de interação da enzima com os fármacos, estudos de fluorescência sincronizada foram analisados mais adiante.

Figura 26 - Espectro de emissão de fluorescência da AChE e sua supressão pela adição da Pazopanibe a 296 K (A), 306 K (B) e 316 K (C). Solução de AChE em Tris-HCl 0,5 M, pH 8.

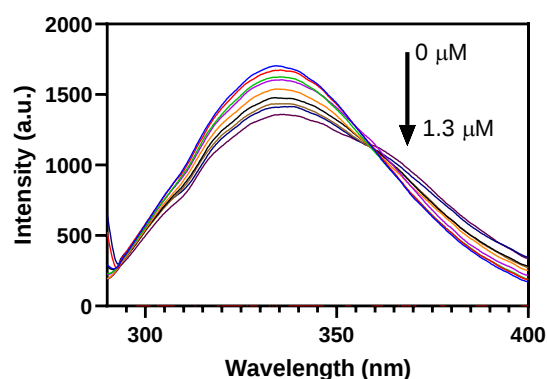
(A)



(B)



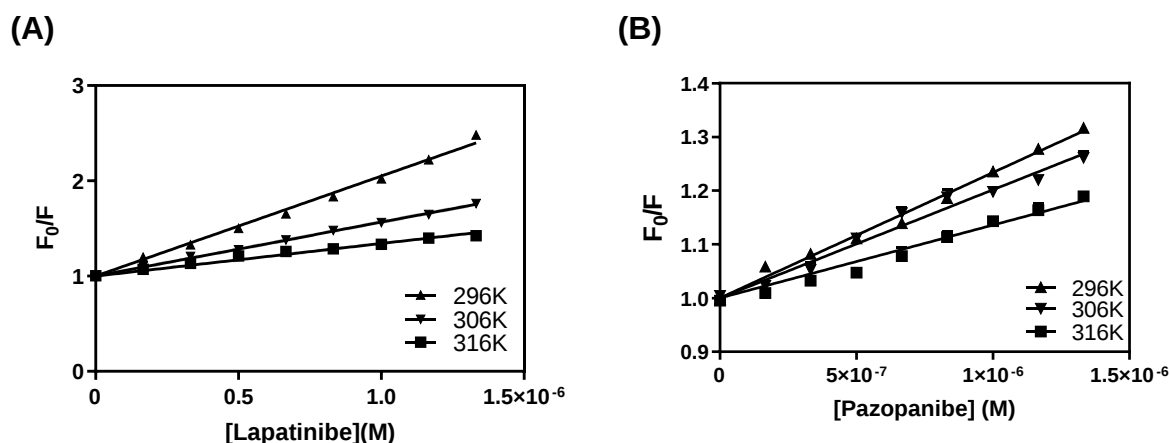
(C)



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da análise do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão foram identificados parâmetros que permitiram a elucidação do mecanismo de interação entre os fármacos e a AChE. A determinação do mecanismo de supressão da fluorescência pôde ser verificada através do gráfico de Stern-Volmer (Figura 27) e seu desempenho atrelado à mudança de temperatura durante a interação. A análise dos parâmetros de interação regeu-se pela observância da constante de Stern Volmer (K_{sv}), onde se define que há o mecanismo dinâmico se a K_{sv} aumentar de acordo com o aumento da temperatura, e mecanismo estático se tal constante for inversamente proporcional à temperatura (LAKOWICZ, 2013).

Figura 27 - Gráfico de Stern-Volmer das interações entre o fármaco Lapatinibe e a enzima Acetilcolinesterase (A) e interações entre o fármaco Pazopanibe e a AChE (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

As informações contidas na tabela 2 mostram que os valores de K_{sv} aumentam em temperaturas mais elevadas no caso das interações da lapatinibe-AChE, sugerindo que os mesmos interagem de forma dinâmica. De forma oposta, as interações pazopanibe-AChE descrevem que os valores da K_{sv} diminuem em decorrência do aumento da temperatura, suportando que há a presença do mecanismo estático nesta situação.

Tabela 2 - Parâmetros de ligação e de supressão de fluorescência dos sistemas fármaco-acetilcolinesterase.

Compostos	Temperatura (K)	K_{sv} (10^5)	K_q (10^{13})	K_b (10^5)
Lapatinibe	296	10,49	10,49	6,82
	306	5,66	5,66	2,66
	316	3,42	3,42	0,46
Pazopanibe	296	2,33	2,33	2,42
	306	2,01	2,01	1,90
	316	1,35	1,35	1,09

Fonte: Elaborado pela autora.

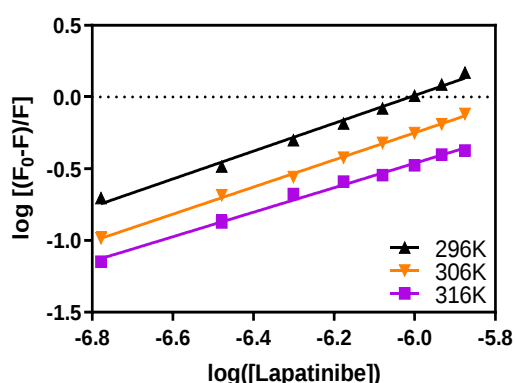
Partindo-se do K_{sv} também foi calculada a constante de velocidade bimolecular de supressão (K_q), resultando em valores na ordem de 10^{13} . Considerando que os valores de K_q obtidos aumentaram em uma ordem de grandeza se comparados com o valor máximo de K_q para a supressão dinâmica em proteínas ($2 \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$), entende-se que há a presença do mecanismo de quenching estático nos dois casos estudados (MAKARSKA-BIALOKOZ; LIPKE, 2019). As constantes dispostas na tabela 2 diminuem de acordo com o aumento de temperatura, significando que o mecanismo de supressão estática é desfavorecido a temperaturas altas, pois são nessas condições que as interações do complexo não fluorescente formado são enfraquecidas, proporcionando a diminuição das constantes.

A constante K_b representa o grau de afinidade entre a biomolécula e o ligante, por isso é um parâmetro de substancial relevância. Do ponto de vista farmacológico, as interações moderadas são interessantes devido à alta eficiência na biodistribuição de fármacos no organismo, possibilitando que o medicamento atinja o seu alvo molecular de maneira apropriada. Em contraste, interações fracas levam a meias-vidas curtas e impedem o transporte da substância pelas biomoléculas, enquanto interações muito fortes reduzem a concentração da substância livre no plasma devido à rápida eliminação pelo organismo (CHEN *et al.*, 2011).

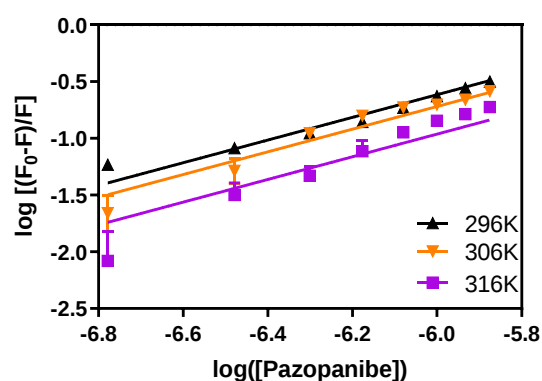
Os valores da constante K_b (Tabela 2) foram analisados pelos gráficos de Stern-Volmer modificado (Figura 28), obtendo-se números da ordem de grandeza de 10^5 L / mol, sinalizando moderadas interações entre os compostos e a AChE. Comparando-se os dois medicamentos estudados observa-se que nas três temperaturas a lapatinibe apresenta maior afinidade à enzima, fator que ratifica os estudos de inibição enzimática. É importante levar em conta que o tipo de inibição dos fármacos predominante revela a dependência da presença do substrato para a formação do complexo enzima-substrato-inibidor. Como os estudos de interação foram realizados sem a presença de substrato, é compreensível que a K_b calculada possa denotar menor contato entre a AChE e os fármacos do que a real interação observada *in situ*.

Figura 28 - Gráfico de duplo logarítmico das interações entre o fármaco Lapatinibe e a enzima Acetilcolinesterase (A) e do fármaco Pazopanibe e a enzima Acetilcolinesterase (B).

(A)



(B)



Fonte: Elaborado pela autora.

Confrontando os resultados obtidos com dados recentes da literatura, foram encontrados valores de K_b com equivalente ordem de grandeza para interações de AChE com a tacrina (composto aprovado para tratamento da DA), piperina, curcumina e silibilina (SARAVANAN *et al.*, 2021). Por outro lado, estudos com os medicamentos originalmente aprovados para tratamento de diabetes tolbutamida e clorpropamida mostram que os valores de K_b se encontram em torno de 10^4 havendo 10 vezes mais afinidade da AChE com os fármacos lapatinibe e pazopanibe se comparados com tais medicações antidiabéticas (BARUAH *et al.*, 2021). Neste mesmo estudo notou-se que o fármaco glibenclamida apresentou

constante de afinidade bastante equivalente ao lapatinibe, apesar das performances enzimáticas não se assimilarem entre si.

Informações termodinâmicas relativas a interação foram determinadas pelos gráficos relacionado a energia livre de Gibbs (ΔG°) com o uso das K_b calculados experimentalmente. Ao utilizar as inclinações e os intercepto no eixo y dos gráficos na figura 29, determinaram-se os valores de ΔH° , ΔS° e ΔG° , que podem ser evidenciados na Tabela 3.

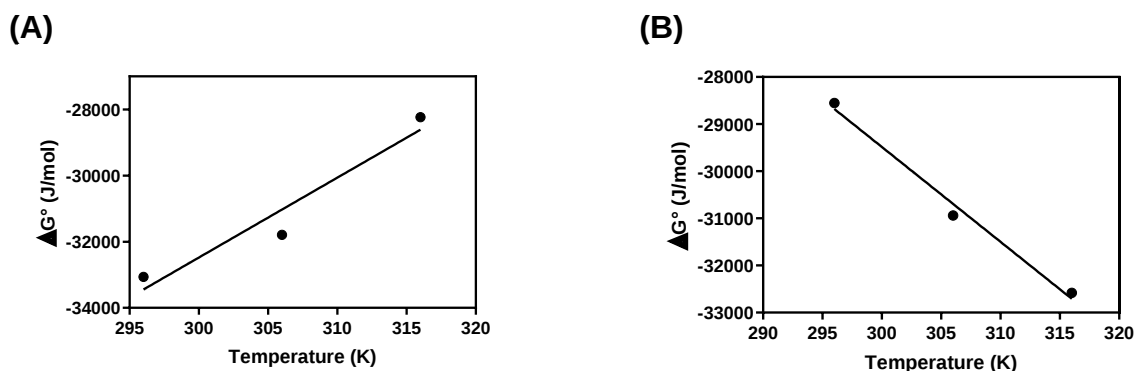
Tabela 3 - Parâmetros termodinâmicos da interação fármaco-acetilcolinesterase. Mudança dos valores de Entalpia (ΔH°), Entropia (ΔS°) e Energia livre de Gibbs (ΔG°) com a variação da temperatura.

Compostos	Temperatura (K)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	ΔS° (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)	T. ΔS° (kJ.mol ⁻¹)	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)
Lapatinibe	296	-104,97	-241,60	-71,51	-33,06
	306			-73,92	
	316			-76,34	-31,79
Pazopanibe		30,94	201,40		-28,23
	296			59,61	-28,55
	306			61,62	
	316			63,64	-30,94
					-32,58

Fonte: Elaborado pela autora.

Através dos sinais positivos ou negativos dos parâmetros termodinâmicos é possível avaliar quais os tipos de contribuições de ligação estão envolvidos nas interações fármaco-AChE. Valores de ΔH° e ΔS° positivos para o sistema AChE-Pazopanibe caracterizam a relação com interações hidrofóbicas, já valores negativos para ambos parâmetros mostram que a força de ligação do sistema AChE-Lapatinibe são provenientes de forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio (FATHI *et al.*, 2019; ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). O tipo de interação envolvida entre as interações dos fármacos e a AChE poderá ser discutida com maior propriedade no tópico que contém o estudo teórico de ancoragem molecular, onde serão relacionadas as estruturas químicas dos fármacos aos efeitos observados na enzima experimentalmente.

Figura 29 – Relação ΔG° vs. Temperatura para a interação Lapatinibe-Acetilcolinesterase (A) e para a interação Pazopanibe-Acetilcolinesterase (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores de ΔG° calculados demonstram a espontaneidade das interações analisadas. O fator $T.\Delta S^\circ$ informa o parâmetro termodinâmico que contribui nas interações com maior predominância. Como o valor $T.\Delta S^\circ$ das interações Pazopanibe-AChE se mostrou maior do que a entalpia, entende-se que tais interações são dirigidas entropicamente, fato compatível com a presença de interações hidrofóbicas, pois o aumento de graus de liberdade da água libertada no processo de dessolvatação de pazopanibe e AChE para a ocorrência de interações hidrofóbicas corresponde a um sistema de entropia elevada. O oposto ocorre com as interações Lapatinibe-AChE, que espelha o valor de $T.\Delta S^\circ$ menor que ΔH° revelando que há maior contribuição da entalpia, situação aceitável para as forças de interação descritas para este sistema.

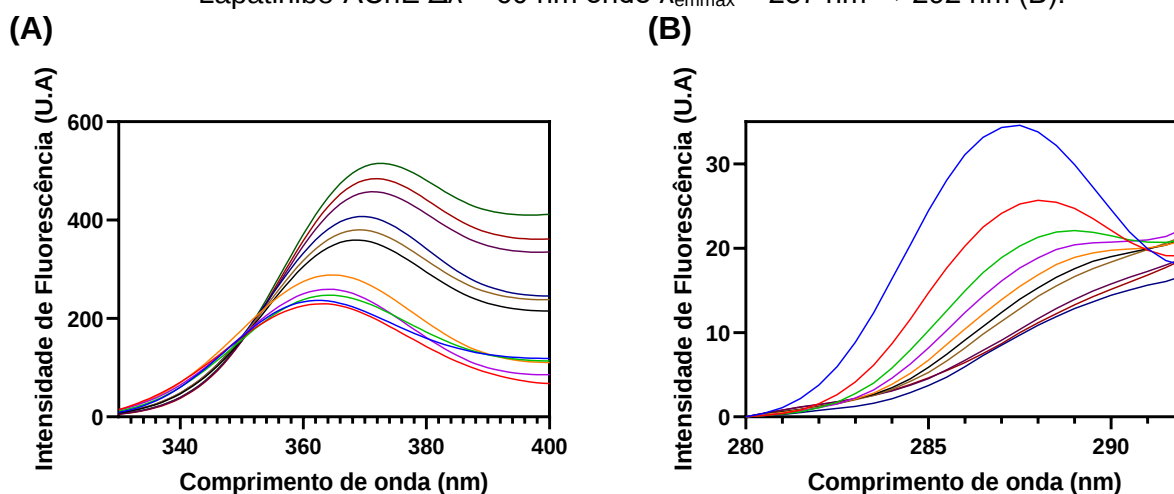
2.3.3 Mapeamento das alterações no microambiente dos fluoróforos da AChE

2.3.3.1 Fluorescência síncrona

A espectroscopia de fluorescência síncrona revela informações sobre alterações no ambiente molecular ao redor da vizinhança dos cromóforos (resíduos de triptofano e tirosina da enzima). Tais informações são obtidas a partir da análise do deslocamento da posição do pico máximo de emissão do espectro (SURYAWANSHI *et al.*, 2016) (MAKARSKA-BIALOKOZ; LIPKE, 2019). Na Figura 30, os espectros das interações Lapatinibe-AChE apresentam relevantes

deslocamentos batocrômicos (desvios para o vermelho) para os $\lambda_{\text{em máx}}$ dos resíduos de triptofano ($287 \text{ nm} \rightarrow 292 \text{ nm}$) e de tirosina ($362 \text{ nm} \rightarrow 373 \text{ nm}$). Estes desvios podem sugerir a mudança conformacional da enzima, de forma que a hidrofobicidade na vizinhança dos resíduos de Trp e Tir diminui e a polaridade do microambiente aumenta.

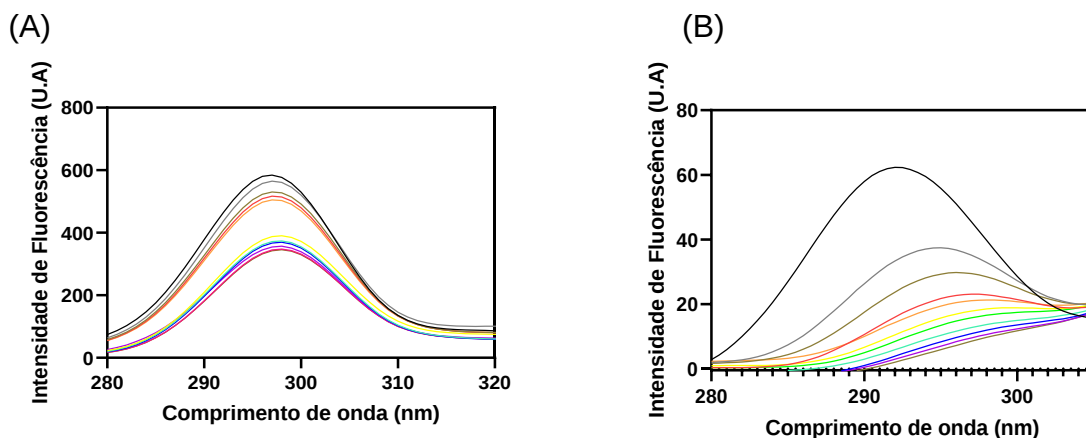
Figura 30 - Espectro de fluorescência sincronizada do sistema Lapatinibe-AChE $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ onde $\lambda_{\text{em máx}} = 362 \text{ nm} \rightarrow 373 \text{ nm}$ (A). Espectro de fluorescência sincronizada do sistema Lapatinibe-AChE $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ onde $\lambda_{\text{em máx}} = 287 \text{ nm} \rightarrow 292 \text{ nm}$ (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 31 se refere aos espectros de fluorescência sincronizada das interações Pazopanibe-AChE. Para os resíduos de tirosina da proteína (Figura 31(A)), não foram observados desvios relevantes no $\lambda_{\text{em máx}}$ ($\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$), levando ao entendimento que não houve perturbação na vizinhança onde se encontram os resíduos de Tir. Em comportamento oposto, os resíduos de triptofano (Figura 31(B)) refletem deslocamento batocrômico do $\lambda_{\text{em máx}}$ notando-se a diferença de 5 nm ao comparar o comprimento de onda máximo de emissão na ausência e na presença de $5,95 \mu\text{M}$ do Pazopanibe. Em relação a mudanças conformacionais no sistema Pazopanibe-AChE, os resultados revelam aumento na polaridade da vizinhança onde os resíduos de Trp se encontram. Sendo assim, pode-se inferir que tal fármaco interage mais fortemente com a proteína em áreas próximas aos resíduos de triptofano (AMEEN *et al.*, 2020).

Figura 31 - Espectro de fluorescência sincronizada do sistema Pazopanibe-AChE $\Delta\lambda = 15$ nm onde $\lambda_{\text{emmáx}} = 297 \text{ nm} \rightarrow 298 \text{ nm}$ (A). Espectro de fluorescência sincronizada do sistema Pazopanibe-AChE $\Delta\lambda = 60$ nm onde $\lambda_{\text{emmáx}} = 292 \text{ nm} \rightarrow 297 \text{ nm}$ (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

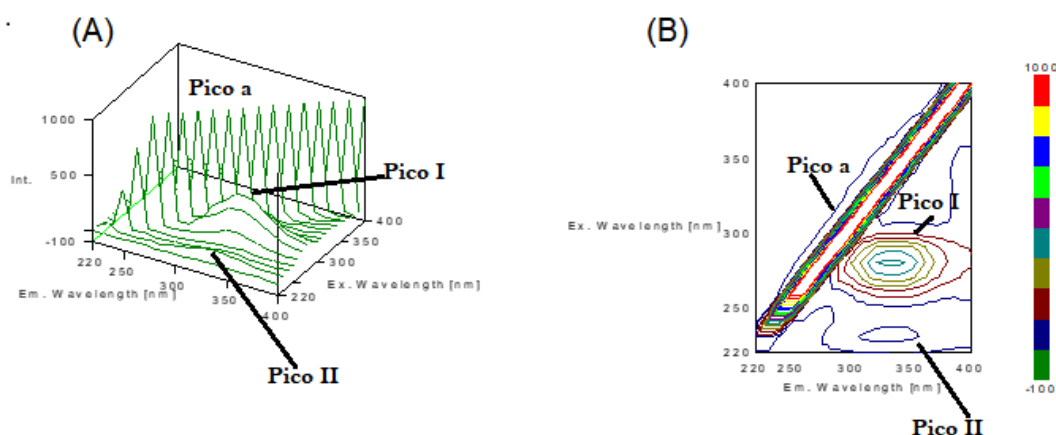
Os resultados evidenciados neste tópico confirmam o mecanismo de inibição proposto entre os fármacos e a AChE, pois as interações entre AChE e lapatinibe interferem nas regiões próximas aos resíduos de triptofano e tirosina, sendo estes dois constituintes do sítio catalítico da acetilcolinesterase, reafirmando a presença de lapatinibe no arcabouço proteico e coerente com o mecanismo de inibição incompetitivo. Enquanto a suave perturbação nos resíduos de tirosina para as interações entre AChE e pazopanibe certifica que este fármaco interage em local diferente no sítio ativo, validando desta forma o mecanismo de inibição não-competitivo.

2.3.3.2 Fluorescência 3D

Assim como o estudo de fluorescência síncrona, as medidas de fluorescência tridimensional são importantes para a compreensão acerca das modificações nas regiões circundantes aos resíduos de aminoácidos fluoróforos, podendo indicar também alterações conformacionais na estrutura de proteínas (ZHANG *et al.*, 2018).

A figura 32 expõe os espectros de fluorescência 3D da enzima AChE (Fig.32(A)) e seu correspondente mapa de contorno (Fig.32(B)), sendo possível observar 3 picos de emissão de fluorescência.

Figura 32 - Espectros de fluorescência 3D (A) e mapa de contorno (B) da AChE.



Fonte: Elaborado pela autora.

O pico a se refere a espalhamentos de radiação conhecidos como efeito Rayleigh de primeira ordem ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$) (LAKOWICZ, 2013; MAURYA *et al.*, 2019; TAYYAB *et al.*, 2019), caracterizado pelo espalhamento inelástico de radiação. O pico I corresponde à fluorescência dos resíduos de triptofano e tirosina onde $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280 \text{ nm}/340 \text{ nm}$. O pico II evidencia as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ envolvidas nas ligações C=O de ligações peptídicas presentes no arcabouço proteico (estruturas secundárias de proteínas) (BORTOLOTTI *et al.*, 2016), onde onde $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 230 \text{ nm}/340 \text{ nm}$. Nesta perspectiva, as mudanças no pico I e II foram analisadas com a adição dos fármacos, pois essas alterações podem indicar alterações no microambiente dos fluoróforos, bem como podem sugerir alterações na estrutura secundária da proteína. Os valores na redução da intensidade de fluorescência 3D podem ser avistados na tabela 4.

Tabela 4 - Dados obtidos da fluorescência tridimensional da AChE e dos sistemas fármaco-AChE.

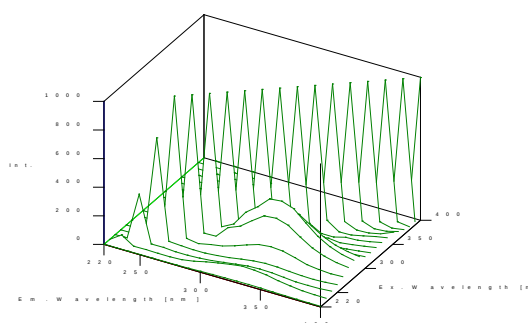
Sistema	Pico I [$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm/nm)]	Stoke $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade (A.U.)	Pico II [$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm/nm)]	Stoke $\Delta\lambda$ (nm)	Intensidade (A.U.)
AChE	280/340	60	407,53	230/340	110	88,66
AChE-Lapatinibe	280/340	60	391,50	230/330	100	81,58
AChE-Pazopanibe	280/340	60	395,98	230/330	100	83,13

Fonte: Elaborado pela autora.

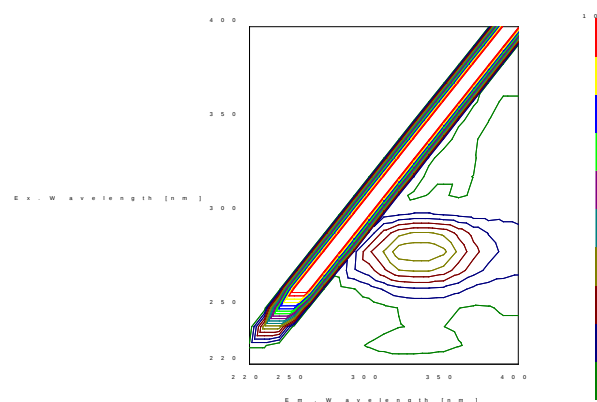
Figura 33 demonstra o espectro de fluorescência 3D (A) e os mapas de contorno (B) da AChE na presença da lapatinibinibe. As intensidades do pico I reduziram em cerca de 4% e do pico II diminuíram em torno de 8% para interações AChE-Lapatinib.

Figura 33 - Espectros de fluorescência 3D (A) e mapa de contorno (B) das interações Lapatinib-AChE.

(A)



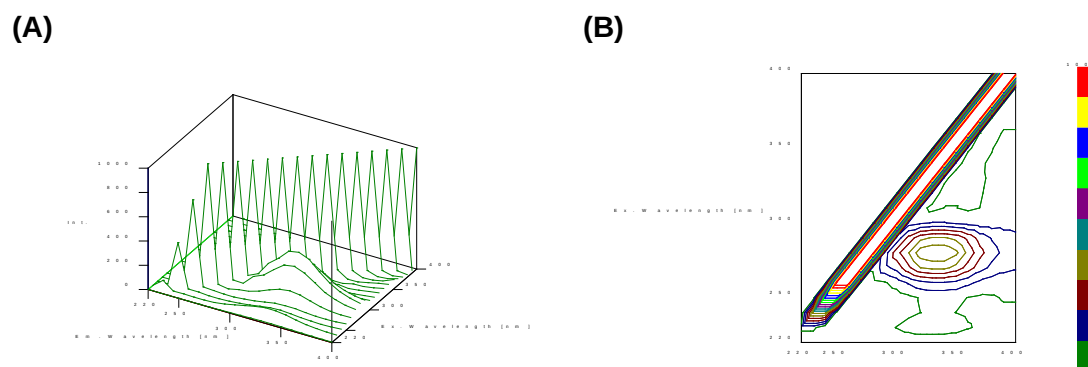
(B)



Fonte: Elaborado pela autora.

Adicionalmente, a Figura 34 expõem o espectro de fluorescência 3D (A) e o mapa de contorno da AChE ao interagir com o fármaco pazopanibe. As intensidades do pico I decresceram em 3% e do pico II diminuiriam 6% para tais interações. Os resultados revelam suave alteração na estrutura secundária da proteína ao interagir com os dois fármacos, confirmando as alterações nas regiões da enzima ao redor dos resíduos de Trp e Tyr conforme identificado nos espectros de fluorescência sincronizada e de fluorescência no estado estacionário.

Figura 34 - Espectros de fluorescência 3D (A) e mapa de contorno (B) das interações Pazopanib-AChE.



Fonte: Elaborado pela autora.

De forma complementar também é possível avaliar as alterações do deslocamento stokes, disponíveis na tabela 4, com o intuito de verificar a mudança de polaridade da enzima com a adição dos ligantes. Ao adicionar os fármacos no sistema, é perceptível a mudança do deslocamento stokes em 10 nm para o pico II, correspondente à cadeia polipeptídica da proteína, sugerindo fortemente mudança da conformação global da AChE decorrente da interação com pazopanibe e lapatinibe. Resultados similares foram encontrados em estudos de interação AChE-Fármacos (SARAVANAN *et al.*, 2021).

2.3.4 Estudo de FRET

O estudo de FRET foi realizado com o objetivo de se mensurar a distância entre os fluoróforos da AChE e pazopanibe. A Figura 35 exibe a sobreposição entre o espectro de absorção do pazopanibe e o espectro de emissão de fluorescência da AChE, indicando a alta probabilidade da ocorrência de transferência de energia não radiativa. A integral de sobreposição dos espectros calculada a partir da Equação 16 resultou no valor de $J = 3,236.10^{13} \text{ nm}^4. \text{M}^{-1}. \text{cm}^{-1}$. A tabela 5 demonstra os parâmetros obtidos para a análise do processo de FRET.

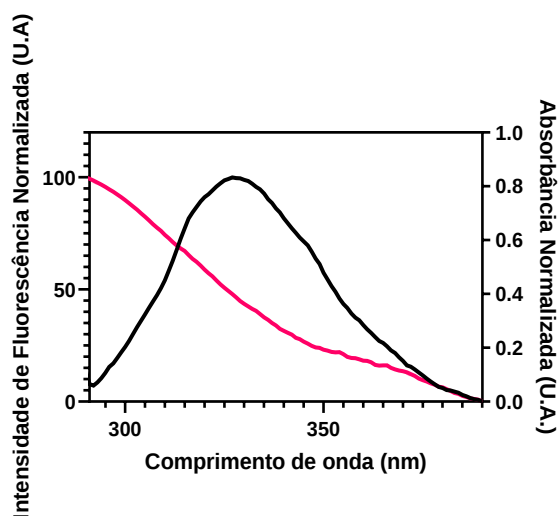
Tabela 5 - Parâmetros de FRET obtidos a partir da interação Pazopanibe-AChE.

$J \text{ (nm}^4. \text{M}^{-1}. \text{cm}^{-1})$	$R_0 \text{ (nm)}$	$r \text{ (nm)}$	E_{FRET}
$3,236.10^{13}$	1,95	2,23	0,308

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir de J e das equações 20 e 21 foram identificados E , R_0 e r , com valores de 0,308, 1,95 nm e 2,23 nm, respectivamente. A distância entre o doador (enzima) e o receptor (fármaco) se encontra dentro da escala de 2-8 nm e satisfaz a dependência $0,5.R_0 < r < 1,5.R_0$ relatada na teoria da transferência de energia não radiativa proposto por Forster (ALMUTAIRI *et al.*, 2020).

Figura 35 - Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da AChE (linha preta) e absorção da Pazopanibe (linha rosa) a 298 K. $[AChE] = [Pazopanibe] = 1,19 \text{ nmol.L}^{-1}$.



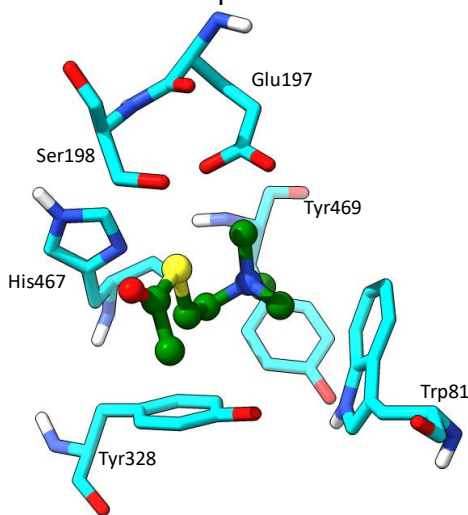
Fonte: Elaborado pela autora.

2.3.5 Análise dos sítios de ligação por estudos *in silico*

Estudos teóricos computacionais são ferramentas essenciais para a identificação de novas interações entre macromoléculas com ligantes bioativos, trazendo informações adicionais aos resultados observados experimentalmente, principalmente em relação ao tipo de interação em cada região da estrutura do ligante e seu efeito na biomolécula. A Figura 36 mostra a melhor posição de encaixe da acetiltiocolina (ATC) no sítio catalítico de AChE onde a ATC posiciona-se de forma que o sítio aniônico interagia com a amina quaternária (nitrogênio em azul) de ATC e rodeada pelos resíduos hidrofóbicos Trp81, Tyr328 e Tyr469, e o grupo carbonil tioéster (oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo) apontando para o sítio esterásico e a tríade catalítica formada por Glu197, Ser198 e His467.

As principais forças de interação existentes no sistema ATC-AChE são as hidrofóbicas e ânion- π .

Figura 36 - Melhor posição de ancoragem de ATC (verde) encaixada em AChE, usada como estrutura inicial para dinâmica molecular.



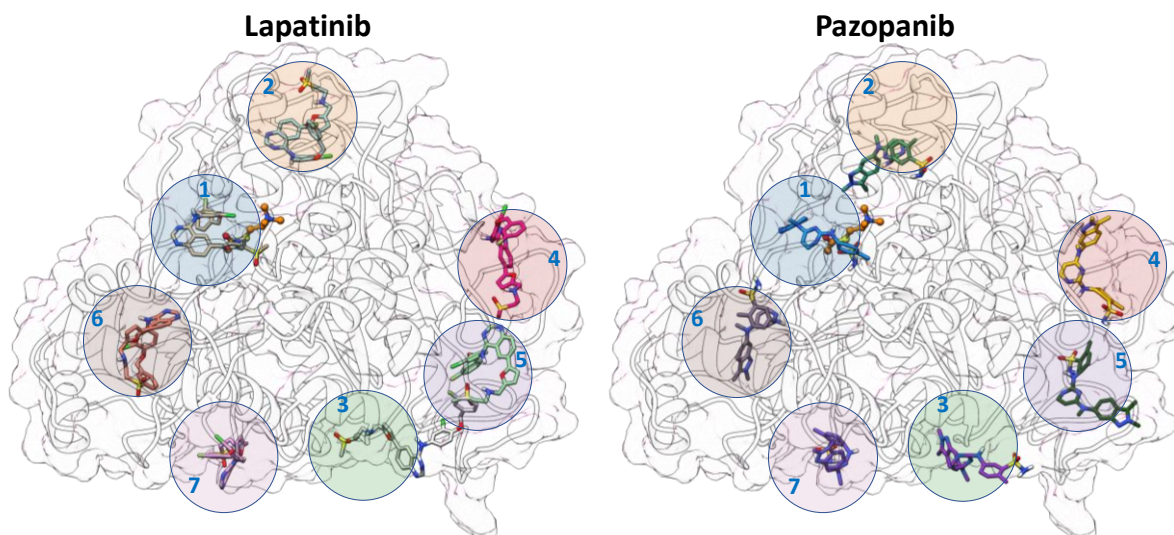
Fonte: (MEIRA MENEZES *et al.*, 2021).

Para a compreensão dos efeitos de lapatinibe e pazopanibe no complexo ATC-AChE, os fármacos foram inseridos nas estruturas representativas obtidas a partir do agrupamento de simulações de dinâmica molecular. Com isso, o agrupamento das melhores posições dos fármacos resultou em 4 sítios para lapatinibe e 6 para pazopanibe, onde 3 deste último se sobrepõem com os sítios de lapatinibe

Desta forma, foram investigados 7 sítios de ligação para as interações, onde as melhores posições para os fármacos em relação ao sistema estão representadas na Figura 37 e a distribuição das melhores pontuações da ancoragem estão dispostas na Figura 38. Estas pontuações informam a afinidade de acoplamento entre a biomacromolécula e o fármaco. As melhores pontuações para a ancoragem molecular dos dois fármacos apresentam valor extremamente semelhante, com valor de -11,8 para pazopanibe e -12,00 para lapatinibe, significando que os mesmos podem estar interagindo na mesma região de ligação com a presença de ATC. Como avistado nas figuras 37 e 38, lapatinibe e

pazopanibe interagem prioritariamente ao sítio 1, ou seja, próximo ao substrato, onde sua melhor posição é demonstrada na Figura 39.

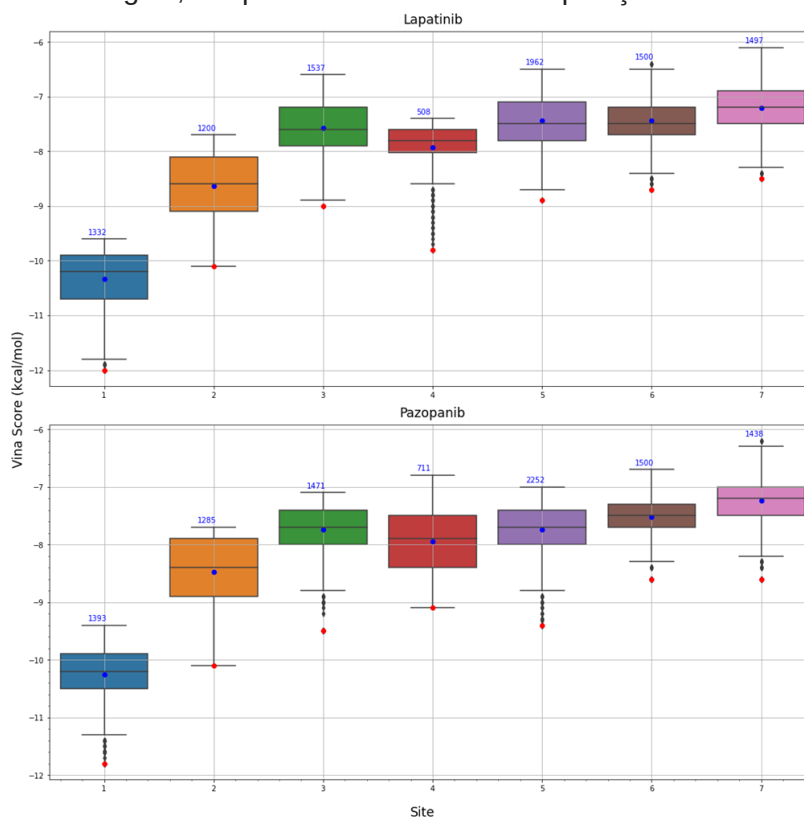
Figura 37 – Melhores posições para as moléculas ancoradas no sistema AChE-ATC. ATC está representada na cor laranja.



Fonte: (MEIRA MENEZES *et al.*, 2021).

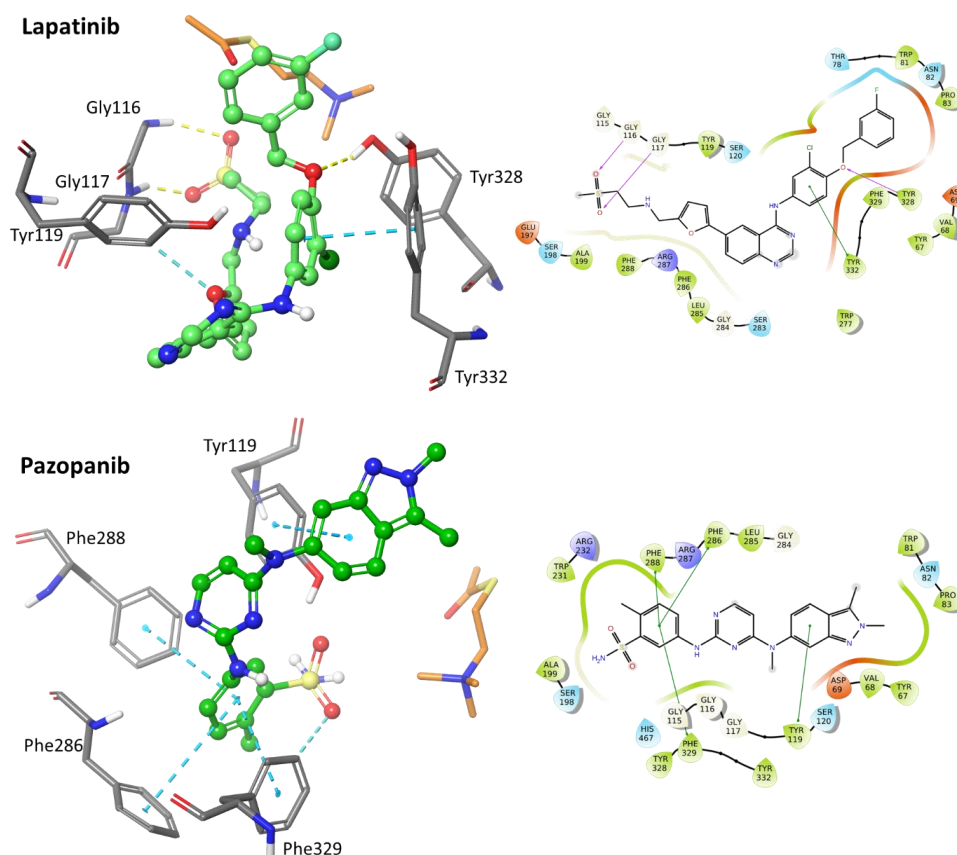
Como observado na Figura 39, o fármaco lapatinib se encontra posicionado com o grupamento metil-sulfona direcionado para o sítio ativo Ser198, e mantido no lugar por fortes ligações de hidrogênio ao NH dos resíduos de glicina Gly116 e Gly117. A outra extremidade da molécula é inserida no sítio aniônico, com Tyr328 estabelecendo uma ligação de hidrogênio ao éster, o primeiro grupo fenil em interações π - π com Tyr332 e o fenil fluorado interagindo com Trp81. Um arranjo semelhante é visto para Pazopanib, com o grupo sulfonamida apontando para Ser198 no sítio esterático, e a extremidade oposta interagindo com o sítio aniônico. Fazendo uma análise comparativa, é perceptível que os resultados teóricos confirmam os estudos realizados experimentalmente, tanto na questão de afinidade proteína ligante e seus diferentes mecanismos de inibição enzimática, quanto em suas interações com os resíduos de aminoácidos fluoróforos.

Figura 38 - Distribuição das pontuações de docking de Vina para cada droga em cada suposto sítio de ligação em AChE-ATC, considerando apenas as posições dentro de 2,5 kcal/mol da posição de melhor pontuação em cada local. Os números acima das barras indicam o número de posições dentro da faixa de energia. Os pontos azuis indicam a média de Boltzmann das energias, e o ponto vermelho indica a posição com melhor classificação.



Fonte: (MEIRA MENEZES *et al.*, 2021)

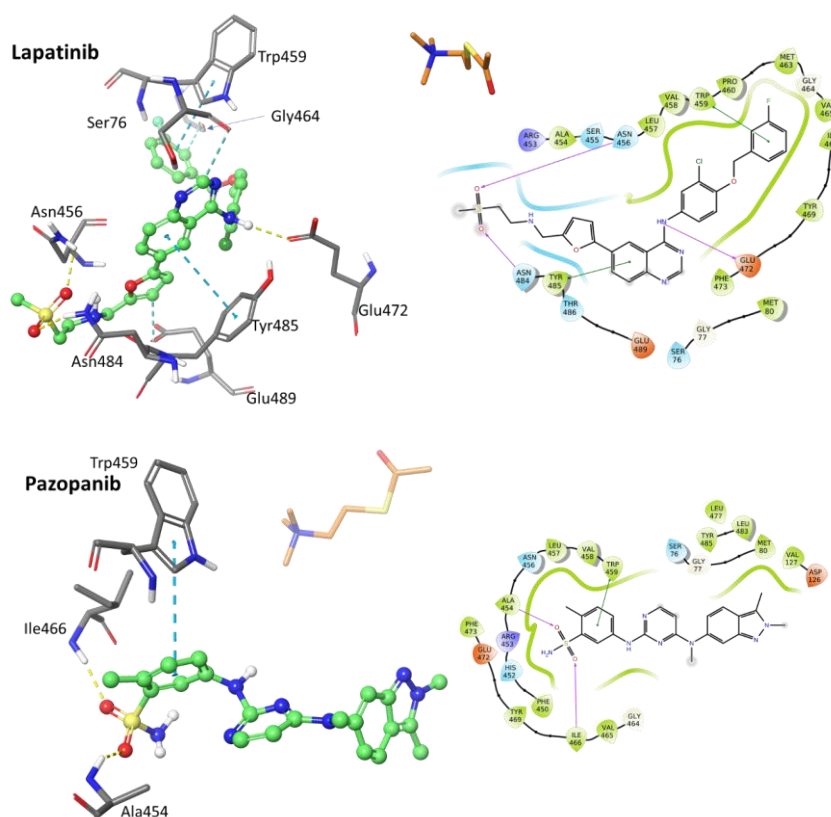
Figura 39 - Melhores posições obtidas para lapatinibe e pazopanibe ancorados no sítio 1 de AChE na presença de ATC.



Fonte: (MEIRA MENEZES *et al.*, 2021).

De acordo com a Figura 38, também é possível observar um segundo sítio de ligação para os fármacos com valores de energia semelhantes com o sítio 1. Este segundo sítio de ligação se localiza ao lado do substrato e posicionado de forma oposta ao sítio 1. As pontuações de ancoragem molecular para as melhores posições são -10,1 tanto para a lapatinibe quanto para pazopanibe. As pontuações semelhantes ao sítio de ligação 1 se justificam pela proximidade entre os dois sítios. A representação dos sistemas estudados no sítio 2 se encontra na Figura 40. Ademais, os dois fármacos interagem via forças π - π com o resíduo de triptofano Trp459.

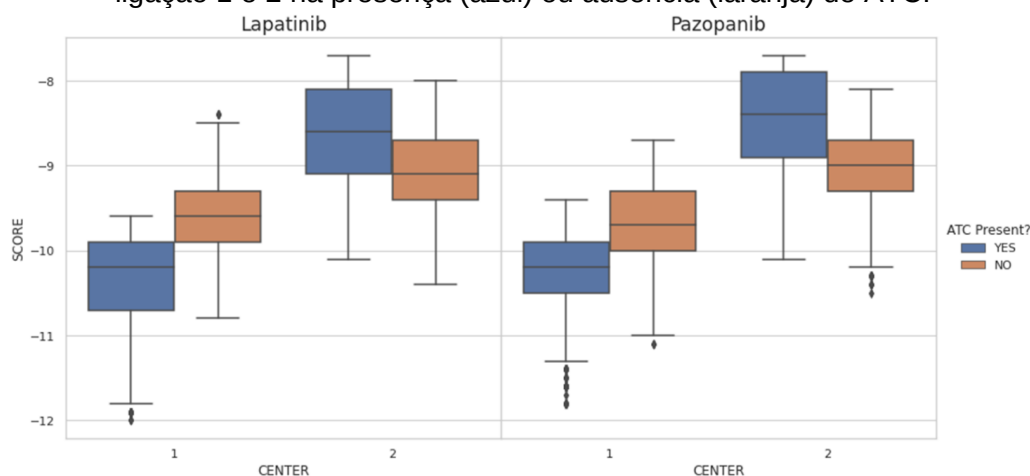
Figura 40 - Melhores posições obtidas para Lapatinibe e Pazopanibe ancorados em AChE-ATC no sítio 2.



Fonte: (MEIRA MENEZES *et al.*, 2021).

Como os resultados de inibição enzimática revelaram o mecanismo não competitivo entre pazopanibe-AChE se abre margem para a possibilidade de haver interação com ou sem a presença de substrato. Esta situação foi verificada pelos métodos computacionais, onde os ligantes foram ancorados com base nos mesmos parâmetros utilizados anteriormente nos sítios 1 e 2. Sem a presença do substrato ATC, os sítios 1 e 2 se sobrepuseram, distinguindo-se das posições obtidas com o substrato. Neste caso, a falta de ATC no sistema de estudo, os fármacos tendem a interagir no sítio de ligação do substrato. A Figura 41 mostra as pontuações de ancoragem para lapatinibe em pazopanibe nos sítios de ligação 1 e 2 na presença e na ausência do substrato, observando-se pontuações similares nos dois casos.

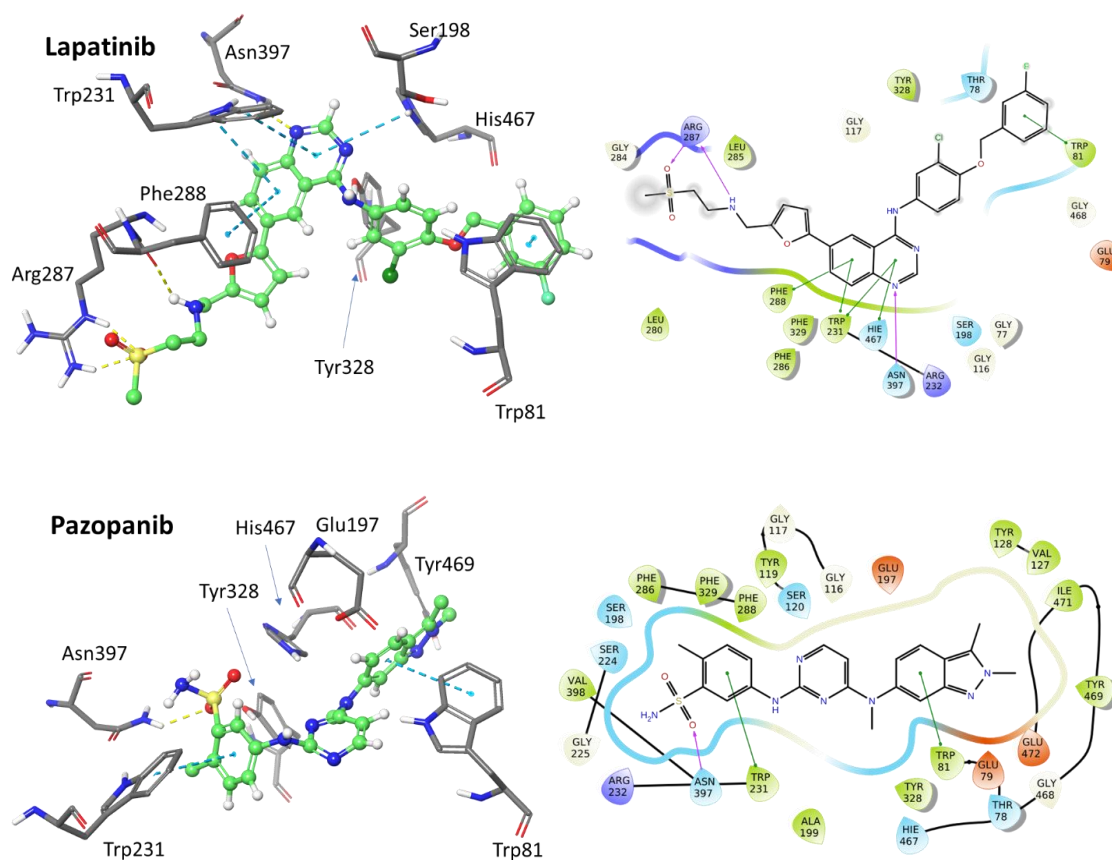
Figura 41 - Distribuição das pontuações de ancoragem para cada droga nos sítios de ligação 1 e 2 na presença (azul) ou ausência (laranja) de ATC.



Fonte: (MEIRA MENEZES *et al.*, 2021) .

A Figura 42 mostra as melhores posições obtidas na ancoragem dos fármacos no sítio de ligação 1 na ausência do substrato. O resíduo de triptofano Trp81 presente no sítio catalítico aniônico também faz uma interação de empilhamento- π com o anel contendo flúor em lapatinibe. A quinazolina estabelece interações de empilhamento- π com His467, situado na tríade catalítica, além de entrar em contato com Trp231 e Phe288, fazendo também ligações de hidrogênio com Asn397. O resíduo Trp81 também estabelece uma interação π - π com o grupamento indazol presente na estrutura de pazopanibe. Adicionalmente, o grupo sulfonamida também estabelece uma ligação de hidrogênio com o resíduo Asn397, suportada de forma adicional por uma interação de empilhamento- π . Sabendo do tipo de mecanismo inibitório da lapatinibe, percebe-se a importância da adição do substrato no estudo das interações, por isso os estudos de ancoragem molecular levados em consideração para as interações ocorridas entre AChE e lapatinibe foram os realizados na presença de ATC. Por outro lado, as análises envolvendo pazopanibe com substrato resultaram na interação deste fármaco com poucos resíduos de aminoácidos. Além disso, as interações de pazopanib com os resíduos fluoróforos Trp e Tyr são melhor descritos nas interações do medicamento sem o substrato, como notado na Figura 42.

Figura 42 - Melhores posições obtidas para Lapatinibe (Pontuação Vina -10,8) e Pazopanibe (Pontuação Vina -11,1) ancorados no Sítio 1 na ausência de ATC.



Fonte: (MEIRA MENEZES *et al.*, 2021).

3 EFEITOS DA GLICAÇÃO DA ALBUMINA SÉRICA HUMANA NA INTERAÇÃO COM OS FÁRMACOS PAZOPANIBE E LAPATINIBE

3.1 Introdução e objetivos

Pazopanibe e lapatinibe são medicamentos utilizados como inibidores das proteínas tirosina quinase, impedindo o crescimento e proliferação de células tumorais (SNEED *et al.*, 2019). Com ação antiangiogênica, pazopanibe possui propriedades de inibição em uma variedade de alvos moleculares, como no VEGFR-1, 2 e 3, o PDGFR- α e β , o FGFR-1 e 3, dentre outros (CHELLAPPAN *et al.*, 2017; SNEED *et al.*, 2019), enquanto lapatinibe atua nos receptores EGFR/HER1 e HER2.

Pazopanibe é um medicamento aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 2009 para combater o câncer de células renais avançado (RCC) (PICK; NYSTROM, 2012), e em 2012 para sarcoma de tecido mole avançado (STS) em pacientes tratados previamente com quimioterapia (VANTINE; TRENT, 2019). Enquanto lapatinibe tem aprovação pela FDA para terapias de câncer de mama em estágio avançado (RYAN *et al.*, 2008). Além disso, pazopanibe e lapatinibe tem protagonizado uma série de estudos de triagem clínica para tratamento dos mais diversos tipos de tumores (CRISTOFANILLI *et al.*, 2013; KERKLAAN *et al.*, 2015; KOINIS *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2014; WARD *et al.*, 2012), reforçando deste modo sua importância farmacológica.

Nas atividades envolvidas na ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) de um fármaco, as proteínas do plasma são fundamentais, tendo em vista seu papel como carreador de fármacos na circulação sanguínea (BOHNERT; GAN, 2013). Por isso, interações entre fármacos e proteínas do plasma desempenham papel importante em questões farmacocinéticas e farmacodinâmicas, influenciando no volume de distribuição de um fármaco e sua biodisponibilidade (WANAT, 2020). Interações muito fortes levam à redução da distribuição do fármaco ao alvo molecular, à necessidade de doses mais altas, e ao prolongamento da meia vida do fármaco. Por outro lado, interações fracas

dificultam a circulação do fármaco no organismo, impedindo sua efetividade terapêutica (LI *et al.*, 2015; NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).

Dentre as proteínas plasmáticas transportadoras, uma das mais abundantes é a albumina sérica humana (HSA). A HSA tem preferência de ligação à moléculas ácidas e hidrofóbicas (WANAT, 2020), sendo esta última uma característica de pazopanibe e lapatinibe (NGUYEN; SHAYAH, 2013; WILSON *et al.*, 2015). A albumina sérica tem a habilidade de se ligar à fármacos de forma reversível, além disso, ligações entre HSA e fármacos podem reduzir a toxicidade e aumentar a solubilidade dos medicamentos em meio fisiológico (WU *et al.*, 2018). Portanto, é de grande relevância o desenvolvimento de estudos de interação entre proteínas plasmáticas e fármacos na área da química medicinal, conforme constatado o impacto de tais interações na eficácia dos medicamentos.

Em pacientes diabéticos e com doença de Alzheimer, devido ao alto estresse oxidativo em seus organismos é comum haver o alto nível de glicose no sangue (hiperglicemia), fato que leva ao aumento da concentração de HSA glicada (gHSA) na corrente sanguínea (SINGH; MITRA, 2019; STOLZING *et al.*, 2006). Em casos de hiperglicemia, cerca de 30% da HSA se transforma em gHSA (SARMAH *et al.*, 2020), fato que suscita questões em relação às alterações no transporte de compostos endógenos e exógenos por conta de processos de glicação.

Desta maneira, o presente trabalho relata um estudo *in vitro* sobre as interações entre pazopanibe e lapatinibe com HSA e sua forma glicada, através técnicas espectroscópicas e estudos bioinformáticos de ancoragem molecular, com o objetivo de identificar as características do mecanismo de interação, magnitude das forças de ligação, tipos de ligação, bem como os parâmetros termodinâmicos.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Reagentes

A Albumina Sérica Humana livre de ácidos graxos (99%), a albumina sérica humana glicada, a albumina sérica humana, e os fármacos pazopanibe e lapatinibe foram adquiridos na Sigma Aldrich (USA), sendo utilizados sem nenhuma purificação prévia. A solução estoque da HSA e da gHSA foram preparadas na concentração de 5 μM utilizando uma solução tampão contendo Tris-HCl a 0,5 M (pH 7.4). As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição seriada da solução estoque.

3.2.2 Metodologia

3.2.2.1 Medidas de espectroscopia de fluorescência

Os espectros de emissão fluorescência no estado estacionário foram performados a partir da titulação da pazopanibe (0 a 4,86 μM) em uma solução de HSA e gHSA na concentração fixa de 0.3 μM , nas temperaturas de 296 K, 303 K e 310 K. No caso da lapatinibe, as concentrações do fármaco variaram entre 0 e 7,4 μM . O comprimento de onda de excitação foi fixado em 280 nm e o espectro de emissão foi registrado entre 290 nm e 400 nm. A largura das fendas de excitação e emissão foi de 5 nm. Os espectros obtidos foram corrigidos em relação ao efeito de filtro interno de acordo com método descrito previamente (MUSA *et al.*, 2020).

3.2.2.2 Estudo de fluorescência síncrona

A fluorescência síncrona foi realizada com base na variação simultânea dos monocromadores de excitação e emissão, fixando-se uma diferença de comprimento de onda ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). Desta forma, é possível tornar a técnica mais sensível às mudanças no microambiente ao redor dos resíduos de aminoácidos Triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) e Tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) da HSA e gHSA

enquanto a mesma interage com os fármacos. A concentração utilizada para a HSA e gHSA foi de $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, e a concentração dos fármacos variou de 0 a $4,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para pazopanibe e 0 a $7,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para lapatinibe com largura de fenda de excitação/emissão de 5 nm.

3.2.2.3 Espectros de absorção na região UV-Vis

Os espectros de absorção de UV-Vis foram medidos no intervalo entre 200 nm e 400 nm à temperatura ambiente. A uma solução de HSA mantida em uma concentração fixa de $0,3 \mu\text{M}$, alíquotas de pazopanibe foram adicionadas ao sistema em concentrações de 0 e $0,72 \mu\text{M}$. O espectro de absorção de uma solução de pazopanibe na ausência da proteína também foi registrado.

3.2.2.4 Estudo teórico de ancoragem molecular

Estudos de ancoragem molecular foram realizados em colaboração com o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami. A estrutura molecular de Pazopanibe foi obtida do banco de dados ChemSpider com id número 8289501 disponível no site www.chemspider.com. Os modelos de estrutura 3D com diferentes estados de ionização foram construídos através do aplicativo Gypsum-DL (ROPP *et al.*, 2019) e foram obtidos considerando o pH valores entre 6,4 e 8,4. As estruturas cristalográficas de HSA (PDB id: 1AO6 [58]) e gHSA (PDB id: 4IW2 [66]) foram obtidas do banco de dados de proteínas (PDB). Informações relacionadas à formatação de entrada, configuração de protonação das moléculas, cálculo de cargas e especificação de ligações rotativas no ligante e resíduos da proteína, foram realizadas via Autodock Tools (MORRIS *et al.*, 2009), e dados sobre a flexibilidade da ancoragem foram mensurados por meio do aplicativo Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010). O sítio de Sudlow localizado no subdomínio IIA, conhecido também como sítio 1, foi o primeiro sítio candidato investigado. Os resíduos LYS199, LYS195 e GLU292 foram definidos como flexíveis para os cálculos de encaixe neste sítio. Para a gHSA foi analisado o mesmo sítio de ligação, onde apenas os resíduos LYS436 e LYS444 foram definidos como flexíveis. Um segundo sítio localizado no domínio IIB também foi considerado como possível local de interação fármaco-proteína. Para este local,

os resíduos ARG114, ARG117, ASP183, ARG186, LYS190 e LYS519 foram definidos como flexíveis no acoplamento HSA e gHSA. Para análises de interação proteína-resíduos-ligante individuais foi utilizado o software LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 *Analizando a supressão de fluorescência das proteínas*

Como constatado nos capítulos anteriores, o estudo de supressão de fluorescência entre proteínas e ligantes é uma técnica bastante eficaz para a análise das características de interação entre tais moléculas. Nesta situação, a proteína de estudo se trata da albumina sérica humana, constituinte principal do sangue, apresentando resíduos de triptofano e tirosina como os aminoácidos fluoróforos detectáveis no espectro de fluorescência.

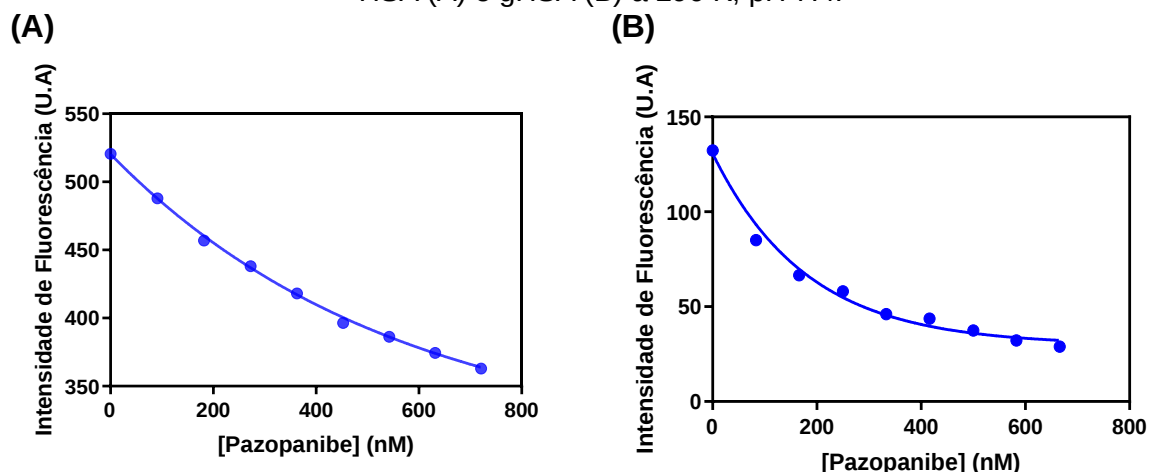
Comparando a intensidade de fluorescência entre HSA e gHSA sem a presença de fármaco, observa-se que a estrutura glicada apresenta menor intensidade. Isto se deve à ligação da proteína com as moléculas de glicose, onde possivelmente as mesmas se encontram ligadas em locais próximos ou exatamente nos resíduos de aminoácidos responsáveis pela fluorescência da proteína, diminuindo desta forma sua intensidade.

A partir disso, já é possível compreender o papel da glicação em estruturas proteicas e a modificação de suas funcionalidades. Notam-se também alterações em relação ao comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência das proteínas, onde para a HSA tem-se $\lambda_{\text{em máx}} = 332 \text{ nm}$ e para gHSA $\lambda_{\text{em máx}} = 338 \text{ nm}$. Isto se deve ao aumento de polaridade proporcionado pelas moléculas de glicose adicionadas à proteína, causando um deslocamento batocrômico.

A intensidade da fluorescência diminui substancialmente conforme a adição de pazopanibe em ambas as proteínas como observado na figura 43. A figura 43 mostra também que a diminuição da intensidade da albumina que sofreu glicação (Figura 43(B)) é mais pronunciada do que a intensidade da albumina sem nenhuma modificação pós traducional (Figura 43(A)) para as três temperaturas.

Portanto, o percentual de redução para HSA é de cerca de 30%, enquanto para gHSA o valor da redução se encontra em torno de 78%. Tal informação preliminarmente demonstra que a ligação dos resíduos de aminoácidos com a glicose favorecem as interações entre pazopanibe e a albumina.

Figura 43 - Intensidade de fluorescência vs. Concentração de Pazopanibe adicionado em HSA (A) e gHSA (B) a 296 K, pH 7.4.

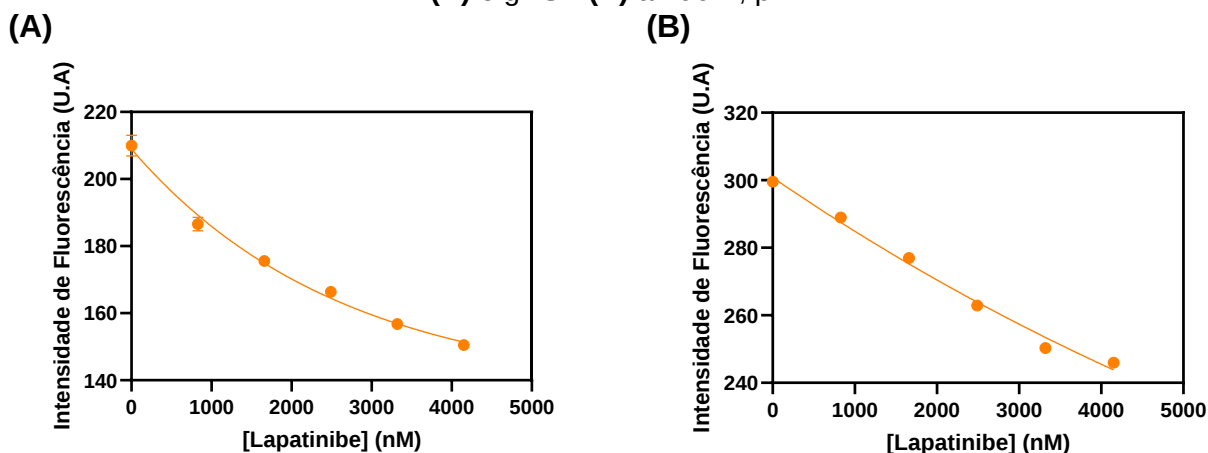


Fonte: Elaborado pela autora.

Para as interações com Lapatinibe, foram medidas as interações com HSA nas temperaturas de 296 K e 303 K para fins de comparação, além de serem mensuradas as interações lapatinibe-gHSA nas três temperaturas. A figura 44 mostra que o evento de supressão da fluorescência de HSA (Figura 44(A)) por parte da lapatinibe foi maior do que da gHSA (Figura 44(B)) à 296 K, tendo o percentual de redução de 28,12% para a HSA e 18,20% para gHSA, inferindo-se maior interação no sistema contendo a albumina não glicada.

Ao comparar os dois medicamentos e suas interações com a albumina e sua estrutura glicada, são notadas discrepâncias no efeito de supressão de fluorescência em cada proteína, onde a presença de glicação favoreceu a interação entre pazopanibe e a albumina, enquanto as interações lapatinibe-albumina foram diminuídas mediante a reação de glicação.

Figura 44 - Intensidade de fluorescência vs. Concentração de Lapatinibe adicionado em HSA (A) e gHSA (B) a 296 K, pH 7.4.



Fonte: Elaborado pela autora.

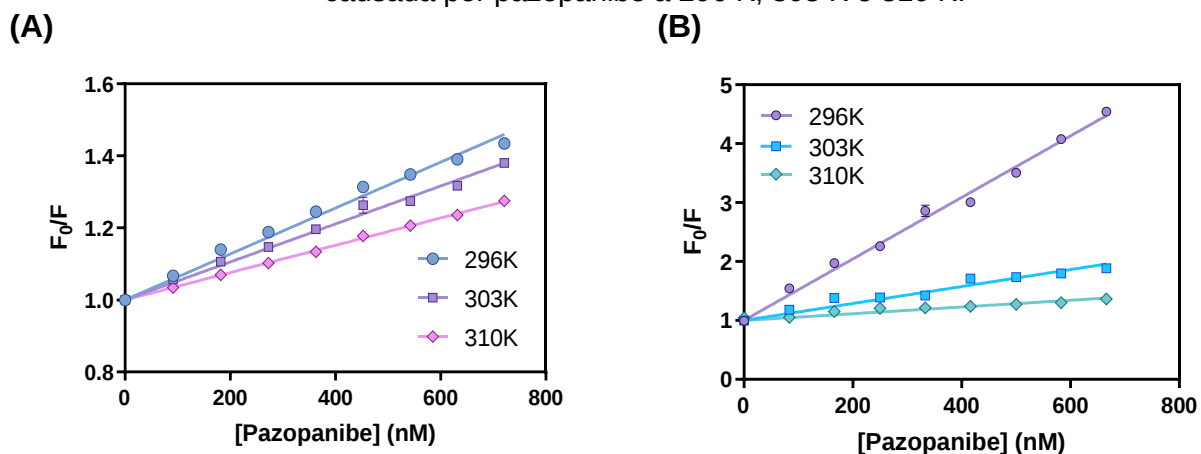
Considerando a literatura científica publicada em periódicos internacionais, tem-se a informação dos sítios de ligação dos medicamentos pazopanibe e lapatinibe na albumina sérica humana. Verifica-se que pazopanibe interage preferencialmente com o sítio I (subdomínio IIA) (KANDANDAPANI *et al.*, 2021) e lapatinibe se liga ao sítio III (subdomínio IB) (KABIR *et al.*, 2016). A diferença nos sítios de ligação dos fármacos pode ser responsável pelas divergências da influência da presença de glicose na albumina nas interações com os fármacos, pois alguns sítios de ligação podem estar ligados a um maior número de moléculas de glicose do que outras, levando em consideração os resíduos de aminoácidos nucleofílicos que são capazes de reagir à glicação.

Conforme relatos científicos, é conhecida a presença de vários sítios de glicação dos resíduos de aminoácidos presentes no sítios I e II da albumina (ANGUIZOLA *et al.*, 2013). Entretanto pouco se sabe da contribuição dos resíduos presentes no sítio III (local de ligação da lapatinibe), fato que pode integrar o objeto de um estudo em trabalhos posteriores. Uma situação que pode ter ocorrido para que houvesse a diminuição da interação da lapatinibe com a albumina glicada consiste no bloqueio do sítio de ligação deste fármaco pelas moléculas de glicose ligadas à proteína, impedindo desta forma a proximidade entre o resíduo de aminoácidos pertencentes ao subdomínio IB e lapatinibe.

3.3.2 Afinidade das interações

Para identificar de forma quantitativa as interações entre a albumina e sua forma glicada com os fármacos a supressão de fluorescência foi analisada através da equação de Stern-Volmer e o duplo logaritmo. Tal análise foi realizada estimando-se os parâmetros de interação como a constante de Stern-Volmer (K_{SV}), bem como a constante de ligação K_b . Os gráficos de Stern-Volmer foram preparados para obtenção dos parâmetros de interação HSA-Pazopanibe (Figura 45(A)) e gHSA-pazopanibe (Figura 45(B)). A partir desta equação, os valores K_{SV} foram determinados e resumidos na Tabela 6.

Figura 45 - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da HSA (A) e gHSA (B) causada por pazopanibe a 296 K, 303 K e 310 K.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6 - Parâmetros de ligação entre Pazopanibe-Albumina

Amostra	Temperatura (K)	K_{SV} (10^5 M^{-1})	K_b (10^5 M^{-1})
HSA-Pazopanibe	296	$6,37 \pm 0,13$	$6,76 \pm 0,10$
	303	$5,27 \pm 0,09$	$5,50 \pm 0,09$
	310	$3,79 \pm 0,02$	$3,80 \pm 0,09$
gHSA-Pazopanibe	296	$52,20 \pm 0,56$	$7,76 \pm 0,10$
	303	$14,40 \pm 0,35$	$2,29 \pm 0,05$
	310	$5,70 \pm 0,10$	$0,91 \pm 0,02$

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com esta tabela, os valores de K_{SV} diminuem com o aumento da temperatura para os dois sistemas (HSA e gHSA com pazopanibe), indicando a predominância do mecanismo estático nos dois casos. Os valores de K_{SV} se

encontram em torno de 10^5 M^{-1} , apresentando valores similares com constantes de Stern-Volmer relatadas em outros estudos de interação entre inibidores de tirosina quinase e proteínas (SHEN *et al.*, 2015; TAYYAB *et al.*, 2019). Entretanto comparando-se as duas proteínas, no sistema gHSA-Pazopanibe observam-se valores maiores de K_{sv} , fato que indica maior interação de pazopanibe com a proteína glicada. Isto indica que a presença de glicose ligada a determinados aminoácidos da albumina afeta significativamente o modo de ligação à esta proteína e conseqüentemente o biotransporte de pazopanibe no organismo.

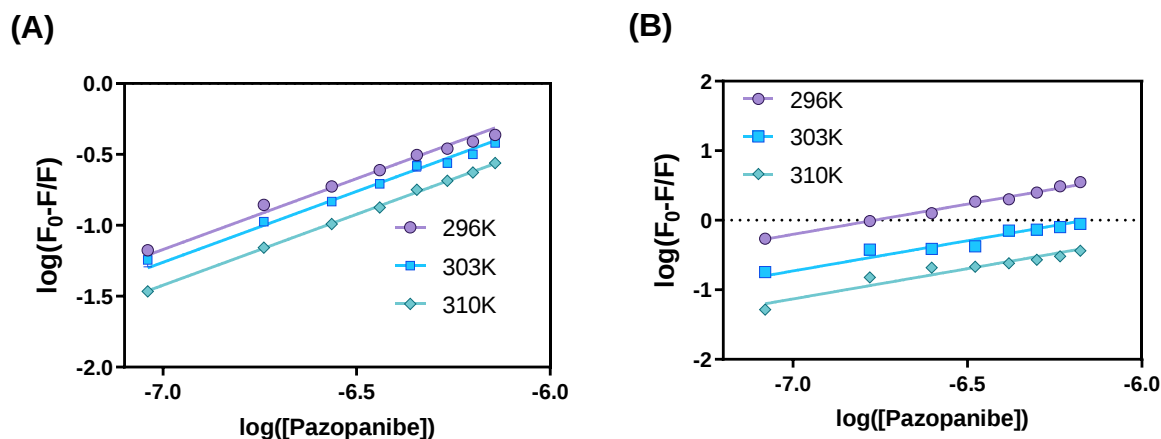
A figura 46 exhibe o gráfico duplo logarítimo para as interações HSA-Pazopanibe (Figura 46(A)) e gHSA-Pazopanibe (Figura 46(B)). Além disso, as constantes de ligação (K_b) determinadas a partir dos gráficos estão resumidas na tabela 6. Os valores de K_b se encontram região entre $6,76 \times 10^5$ e $3,80 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com relação ao sistema HSA-Pazopanibe e entre $52,20 \times 10^5$ e $5,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ no tocante ao sistema gHSA-Pazopanibe. Estes valores se assemelham de forma pronunciada a valores de K_b relatados para interações proteicas com compostos heterocíclicos contendo atividade biológica (KARTHIKEYAN *et al.*, 2020; SINGH, I. *et al.*, 2019).

Do ponto de vista farmacológico, constantes K_b com valores próximos a 10^5 M^{-1} são característicos de interações moderadas, e quando tais valores chegam próximo a 10^6 M^{-1} entende-se que as interações são fortes. Sendo assim quanto maior o valor de K_b , menor será o carreamento do fármaco no corpo humano. Isso sugere que a introdução do carboidrato na estrutura da albumina provoca a diminuição da biodistribuição do medicamento no organismo, isto é, gHSA não realiza o transporte do fármaco pazopanibe de maneira satisfatória. Como resultado, o aumento da força de interação gHSA-Pazopanibe pode reduzir a atividade biológica efetiva do medicamento.

As interações proteína-Pazopanibe analisadas poderiam explicar a baixa biodisponibilidade de Pazopanibe observada em estudos clínicos (DENG *et al.*, 2013). Tais resultados ajudam também a compreender a elevada dose diária necessária de Pazopanibe para tratamentos antineoplásicos, necessitando de 800 mg/dia (VERHEIJEN *et al.*, 2017). Além disso, entende-se o motivo pelo qual a farmacocinética de Pazopanibe varia bastante entre pacientes, tendo em vista que,

dentre outros fatores, cada indivíduo apresenta percentual diverso de albumina glicada no plasma sanguíneo.

Figura 46 - Gráfico duplo logaritmo das interações HSA-Pazopanibe (A) e gHSA-Pazopanibe (B) a 296 K, 303 K e 310 K, pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora.

De forma semelhante, para avaliar quantitativamente as interações Lapatinibe-albumina, foi preparado o gráfico de Stern-Volmer a temperaturas variadas (Figura 47). Com isso, foi visto que HSA e gHSA se portam de diferentes maneiras entre si quando estão interagindo com Lapatinibe. A Figura 47(A) mostra que a inclinação do gráfico, ou seja o K_{sv} diminui com o aumento da temperatura para o sistema HSA-Lapatinibe. Sendo assim, infere-se que o mecanismo das interações é estático. Em contraste, a Figura 47(B) mostra que no caso do sistema gHSA-Lapatinibe, os valores de K_{sv} aumentam em temperaturas altas, significando que a glicação da albumina faz com que as interações desta com Lapatinibe sejam favorecidas em temperaturas maiores. Sendo assim, o mecanismo para gHSA-Lapatinibe é dinâmico. Os valores das constantes de interação são explanados na tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros de ligação entre Lapatinibe-Albumina

Amostra	Temperatura (K)	K_{sv} ($10^5 M^{-1}$)	K_b ($10^5 M^{-1}$)
HSA-Lapatinibe	296	1,01	1,12
	303	0,82	0,82
gHSA-Lapatinibe	296	0,30	-
	303	0,40	-

310

0,44

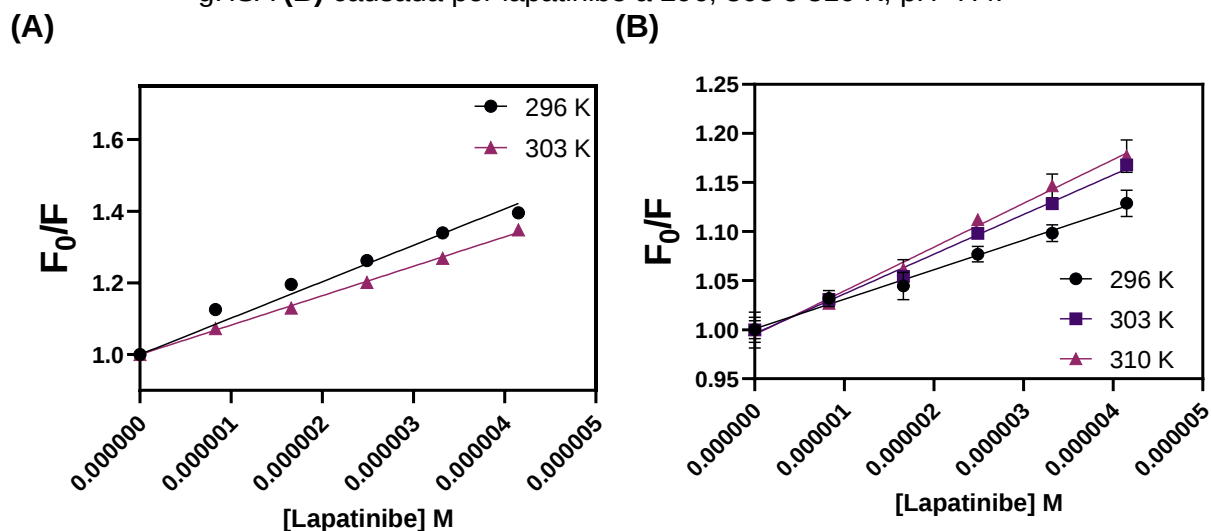
-

Fonte: Elaborado pela autora.

Ao comparar as interações dos dois fármacos com a HSA, nota-se maior força de interação por parte do sistema HSA-Pazopanibe, significando que este pode ser carregado aos alvos moleculares com maior probabilidade do que a Lapatinibe. Os valores de K_{sv} para HSA-Lapatinibe justificam a sua alta dosagem mínima diária terapêutica de 1500 mg por dia (DE JONGE *et al.*, 2013), fato que expõem a baixa biodisponibilidade deste medicamento no organismo humano.

A presença de glicose na albumina influenciou drasticamente nas interações com Lapatinibe, tendo em vista que o mecanismo de supressão de fluorescência foi modificado de estático com a HSA para dinâmico com a gHSA. O mecanismo dinâmico é caracterizado pela interação fármaco-proteína a distâncias intermoleculares maiores do que o mecanismo estático, por isso neste caso não é possível obter parâmetros como a constante de ligação, as forças atuantes e as informações termodinâmicas das interações entre Lapatinibe e a albumina glicada.

Figura 47 - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da HSA **(A)** e gHSA **(B)** causada por lapatinibe a 296, 303 e 310 K, pH=7.4.

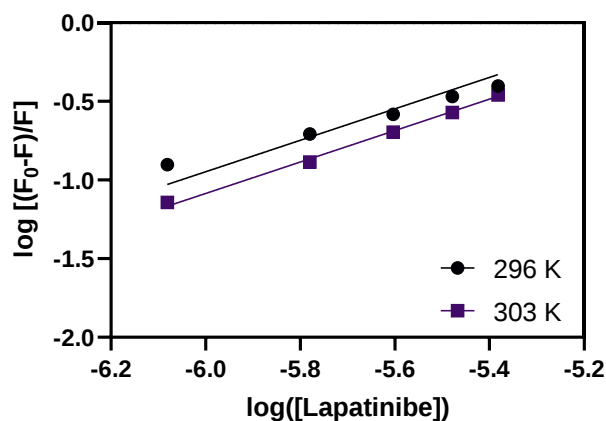


Fonte: Elaborado pela autora.

A partir do gráfico duplo logaritmo (Figura 48) foram mensuradas as constantes K_b , medidas a 296 e 303 K para as interações HSA-Lapatinibe,

resultando em valores de $1,12$ e $0,82 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Tais valores caracterizam interações moderadas assim como as interações albumina-Pazopanibe, permitindo maior distribuição dos medicamentos no corpo. Vale salientar que apesar de a constante de ligação entre proteínas de transporte e fármacos ser um relevante indicativo para a farmacologia de medicamentos, outros diversos fatores podem afetar a farmacocinética e farmacodinâmica de compostos terapêuticos, como pH do meio, interação entre medicamentos, interação com alimentos, interações com outras biomoléculas, entre outros.

Figura 48 - Gráfico duplo logaritmo das interações HSA-Lapatinibe a 296 K e 303 K, pH 7,4.



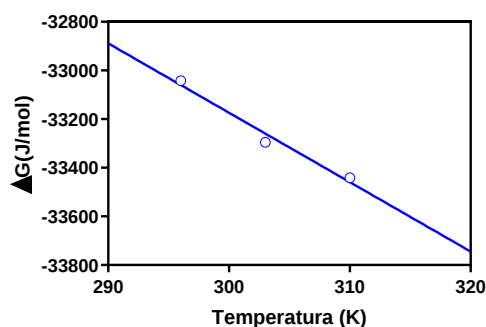
Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.3 Parâmetros Termodinâmicos

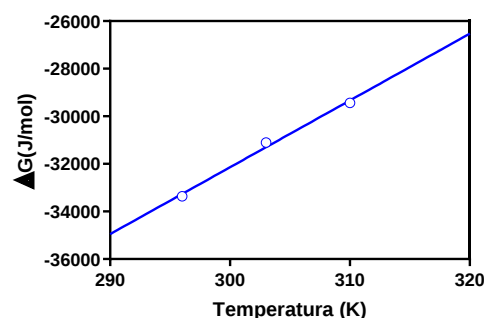
Os parâmetros termodinâmicos para as interações albumina-Pazopanibe foram quantificados usando a relação ΔG° vs. temperatura e estão exibidos na Figura 49, sendo os valores demonstrados na tabela 8. Como pode ser observado na referida tabela, todos os valores de ΔG° são negativos, indicando a espontaneidade das interações aqui estudadas.

Figura 49 - Gráfico de ΔG° vs. Temperatura das interações HSA-PAZO (A) e gHSA-PAZO (B), pH 7,4.

(A)



(B)



Fonte: Elaborado pela autora.

Como mencionado anteriormente, os valores dos parâmetros termodinâmicos podem indicar quais forças estão atuando nas interações (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). Em relação às interações HSA-Pazopanibe, foram constatados valores de entalpia menores que 0 e de entropia maiores que 0, sugerindo que o processo de interação é exotérmico e governado por forças hidrofóbicas, de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Além disso, o valor positivo de ΔS° indica que houve a dessolvatação do sítio de ligação de HSA, processo característico de sistemas onde estão presentes interações hidrofóbicas.

Tabela 8 - Parâmetros termodinâmicos da supressão de fluorescência das interações albumina-pazopanibe.

Amostra	Temperatura (K)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	ΔS° (J.mol ⁻¹)	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)
HSA-Pazopanibe	296	-24,58±0,16	+28,65±0,20	-33,06±0,10
	303			-33,26±0,17
	310			-33,46±0,09
gHSA-Pazopanibe	296	-116,65±0,14	-281,34±0,13	-33,28±0,09
	303			-31,32±0,12
	310			-29,35±0,10

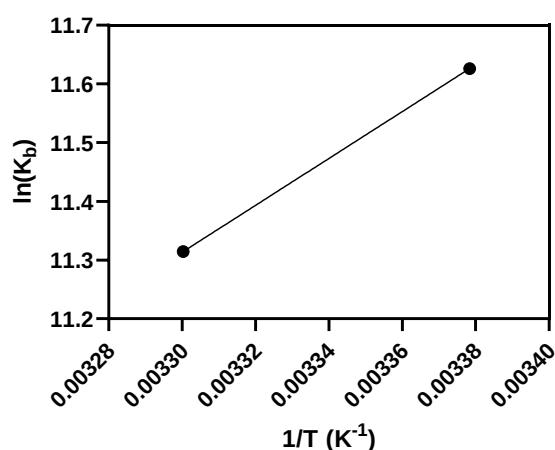
Fonte: Elaborado pela autora.

A adição de glicose na albumina também alterou as forças de interação desta proteína com a pazopanibe, onde no sistema gHSA-pazopanibe, os valores de ΔH° e ΔS° são ambos negativos, fato que indica que o processo de interação também é exotérmico, entretanto as interações são regidas por meio de forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, excluindo as interações hidrofóbicas ocorridas na ausência

de glicação. De forma oposta às interações com HSA, os valores negativos de ΔS° nas interações gHSA-pazopanibe demonstram a exposição dos sítios de interação ao solvente, padrão típico de interações observadas neste sistema.

Os parâmetros termodinâmicos para as interações HSA-Lapatinibe foram extraídas do gráfico de van't Hoff (Figura 50) com valores expostos na tabela 9. Tais resultados evidenciaram valores de entalpia e entropia menores que 0, associando ao envolvimento de forças de interação do tipo Van der Waals e ligações de hidrogênio, além de se tratar de um processo exotérmico. Ademais, a redução da desordem do sistema HSA-Lapatinibe é refletida no valor negativo de entropia.

Figura 50 - Gráfico de van't Hoff das interações HSA-Lapatinibe, pH 7,4.



Fonte: Elaborado pela autora.

A presença do flúor na estrutura química de lapatinibe pode ter sido um fator predominante no tipo de forças de interação presentes no sistema HSA-Lapatinibe, tendo em vista que o flúor tem alto impacto na formação de ligações de hidrogênio, permitindo que a molécula tenha maior hidrofiliabilidade. O oposto pode ser notado na estrutura química de pazopanibe, que possui estrutura mais hidrofóbica do que lapatinibe. Suas propriedades químicas são fatores que influenciam na biodisponibilidade de tais fármacos, pois são estas que definem quais os tipos de interações e a quais biomoléculas se devem ligar durante os processos de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade de um fármaco.

Tabela 9 - Parâmetros de ligação e termodinâmicos da supressão de fluorescência das interações albumina-lapatinibe.

Amostra	Temperatura (K)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	ΔS° (J.mol ⁻¹)	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)
HSA-Lapatinibe	296	-39,21	-15,53	-29,28
	303			-29,16

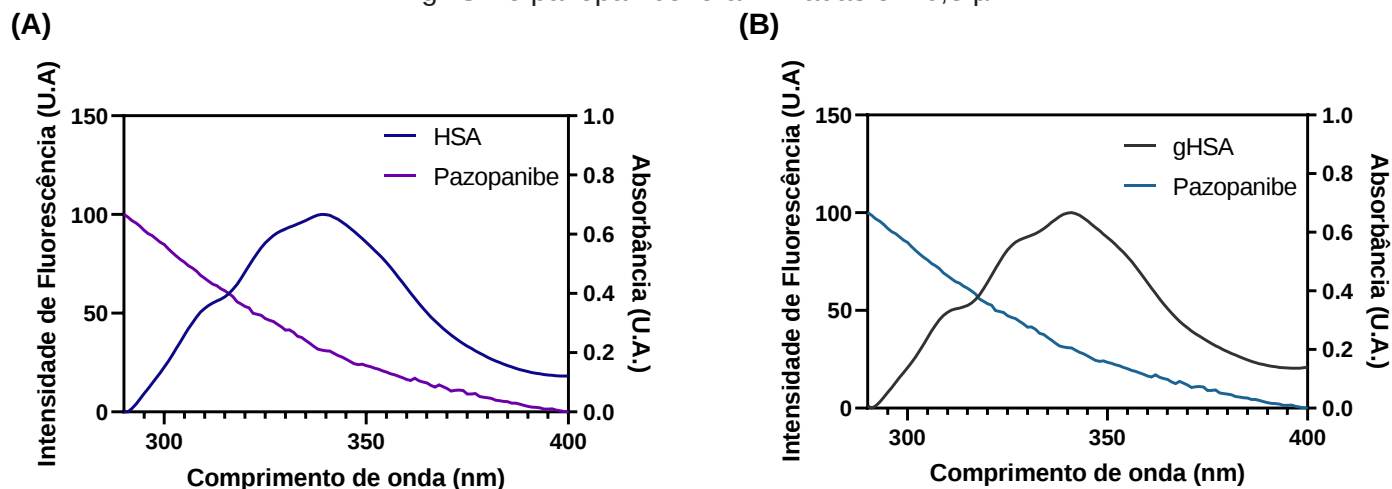
Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.4 Distância entre o fluoróforo e pazopanibe

Como revisado anteriormente, o estudo de FRET tem utilidade nos estudos proteína-ligante com base nas informações extraídas sobre a distância a qual o ligante se encontra dos resíduos de aminoácidos fluoróforos. É conhecido que as interações proteína-ligante podem resultar em uma transferência de energia não radioativa da macromolécula doadora para o ligante (aceitador). Para que essa transferência de energia ocorra, deve haver uma sobreposição espectral entre a absorção do aceitador e a emissão do doador. Além disso, a distância entre a molécula doadora e a aceitadora deve ser menor que 8 nm (MANJUBAASHINI *et al.*, 2018).

A Figura 51 mostra a sobreposição espectral da absorção de pazopanibe com a emissão de fluorescência de HSA (Figura 51(A)) e gHSA (Figura 51(B)), onde os parâmetros de transferência de energia são mostrados na tabela 10. Nos sistemas analisados, observou-se que as distâncias entre a proteína e o fármaco são de 4,47 nm para HSA e pazopanibe e 5,58 nm para gHSA e pazopanibe.

Figura 51 - Sobreposição do espectro de emissão de fluorescência de HSA (A) e gHSA (B) com o espectro de absorção de pazopanibe a 298 K, pH 7,4. As concentrações de HSA, gHSA e pazopanibe foram fixadas em 0,3 μ M.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tais valores são menores do que a distância intermolecular máxima (8 nm), na qual FRET deve ocorrer, por isso se entende que pode haver este tipo de transferência de energia ocorrer nas interações estudadas. Além disso, em ambos os casos, valores de R_0 na faixa de $0,5.R_0$ e $1.5.R_0$ foram reconhecidos, demonstrando a alta possibilidade de transferência de energia não radioativa (CHENG *et al.*, 2017). Adicionalmente, os valores de E_{FRET} mostram que há 58% de probabilidade do FRET ocorre para as interações com HSA, enquanto para gHSA há a diminuição dessa probabilidade para 27%.

Tabela 10 - Parâmetros de FRET obtidos a partir das interações entre a albumina e sua forma glicada com pazopanibe

	J ($\text{nm}^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	R_0 (nm)	r (nm)	E_{FRET}
HSA-Pazopanibe	4.03×10^{15}	4.73	4.47	0.58
gHSA-Pazopanibe	4.04×10^{15}	4.72	5.58	0.27

Fonte: Elaborado pela autora.

Como avistado nos resultados da tabela 10, a presença de glicose interferiu nas interações da albumina com pazopanibe, aumentando a distância entre a molécula doadora e aceptora, além de diminuir a probabilidade de transferência de energia. Isto se deve às forças de interações que modificaram-se a partir da inserção da molécula de glicose na HSA, fazendo com que a distância entre estes impossibilite interações mais fortes em relação ao fluoróforo mais relevante, que é o triptofano-214. O sítio de interação de pazopanibe na proteína

e sua forma glicada pode ter sido alterada, podendo também ser um fator importante a se levar em conta nos resultados de FRET.

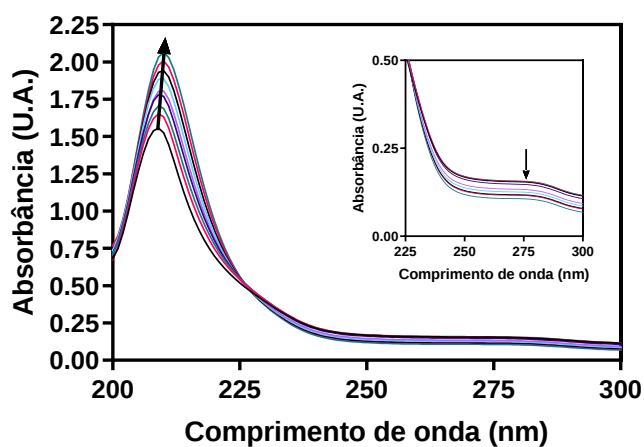
3.3.5 Espectro de absorção UV-Vis

A espectroscopia de UV-Vis é capaz de identificar satisfatoriamente as mudanças em torno da cadeia polipeptídica das proteínas induzidas por interações proteína-ligante. Para compreender de forma mais detalhada as interações albumina-pazopanibe, os espectros UV-Vis de HSA (Figura 52(A)) e gHSA (Figura 52(B)) foram registrados na presença do fármaco. Como pode ser visto, o pico de HSA e gHSA em torno de 212 nm está relacionado a transições $n-\pi$ dos grupos carboxílicos na estrutura do polipeptídeo da proteína. Além disso, o pico em torno de 278 nm está associado às transições $\pi-\pi^*$ de resíduos de aminoácidos aromáticos (LI *et al.*, 2011; SAMARI *et al.*, 2012).

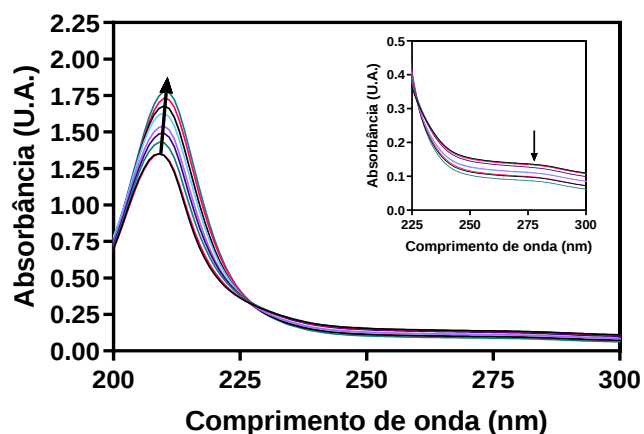
Os espectros de HSA e gHSA apresentam um suave deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima intensidade, saindo de 209 para 210 nm na presença de pazopanibe, indicando alterações na cadeia polipeptídica das duas proteínas. Além disso, uma redução no pico em 278 nm é observada durante o procedimento experimental, o que sugere um aumento da hidrofobicidade, isto é, uma redução da polaridade no microambiente em torno dos aminoácidos aromáticos. Adicionalmente, os espectros de UV-Vis podem indicar a formação do complexo não-fluorescente, onde a existência de alterações do espectro UV-Vis caracterizam a formação de um complexo droga-proteína, enquanto as interações colisionais não modificam o espectro (ABDELAZIZ *et al.*, 2022). Por isso, de acordo com os resultados vistos nos espectros UV-Vis confirma-se o mecanismo estático observado também no estudo de supressão fluorescência para os sistemas de interação estudados.

Figura 52 - Espectros de absorção de HSA (A) e gHSA (B) com concentrações de pazopanibe entre 0,0 e 0,72 μM a 296 K, pH 7,4.

(A)



(B)



Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.6 Espectro de fluorescência síncrona

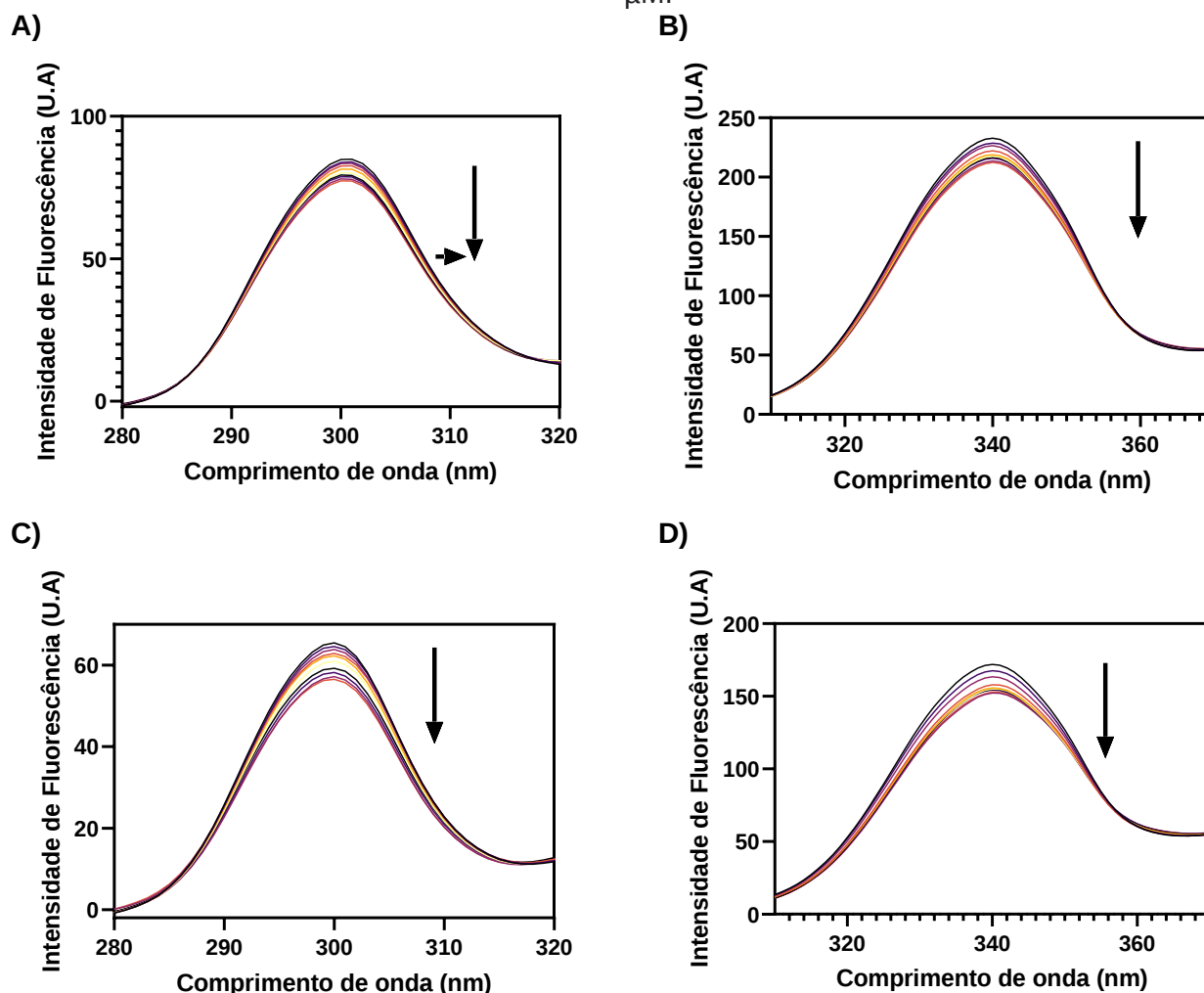
Como relatado previamente, os espectros de fluorescência síncrona mostram as alterações nos microambientes dos resíduos de aminoácidos fluoróforos. A figura 53 mostra espectros de fluorescência para os resíduos de tirosina da HSA (Figura 53(A)) e da gHSA (Figura 53(B)). Também é notado um pequeno desvio para o vermelho no espectro da HSA, com cerca de 1 nm para $\Delta\lambda = 15$ nm, enquanto em $\Delta\lambda = 60$ nm não houve nenhum deslocamento.

Os resultados obtidos sugerem um aumento na hidrofobicidade e uma redução na polaridade da vizinhança em torno dos resíduos de tirosina da HSA, enquanto os resíduos de triptofano não foram impactados fortemente pela presença do fármaco. Com relação às interações entre gHSA e pazopanibe, não foram observados deslocamentos nos espectros dos resíduos de tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) (Figura 53(C)) ou nos resíduos de triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) (Figura 53(D)), mostrando dessa forma que não houveram alterações na polaridade em torno dos fluoróforos analisados presentes na estrutura de gHSA.

As observações feitas nos experimentos de fluorescência síncrona permitem a conclusão do fato que a presença de glicose na albumina reduzem as modificações estruturais da proteína ocasionadas pelas interações com o medicamento pazopanibe, apesar de haver maior diminuição da intensidade de fluorescência nas interações gHSA-Pazopanibe se comparados com a HSA-Pazopanibe. As modificações no microambiente também podem sugerir a proximidade do ligante a determinado sítio de ligação.

Como há apenas um resíduo de triptofano na albumina sérica humana (Trp-214), é plausível deduzir que há maior proximidade de pazopanibe ao Trp-214 na albumina sérica glicada, pois há o aumento na supressão de fluorescência para este resíduo. Para gHSA percebe-se que também há maior supressão de fluorescência no microambiente dos resíduos de tirosina, se comparados com as interações da HSA. Enquanto isso, pazopanibe pode estar mais afastado de Trp-214 na HSA, entretanto, o mesmo está promovendo uma alteração estrutural em alguma região onde resíduos de tirosina se fazem presentes, fato evidenciado pelo deslocamento batocrômico. Todas essas constatações corroboram com os resultados discutidos ao longo da tese, validando desta forma o estudo realizado.

Figura 53 - Espectros de fluorescência síncrona dos sistemas HSA-Pazopanibe com $\Delta\lambda = 15$ nm (A) HSA-Pazopanibe com $\Delta\lambda = 60$ nm (B) gHSA-Pazopanibe com $\Delta\lambda = 15$ nm (C) gHSA-Pazopanibe com $\Delta\lambda = 60$ nm (D). [HSA] = [gHSA] = 0,3 μ M; [Pazopanibe] = 0 - 0,72 μ M.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.7 Ancoragem molecular

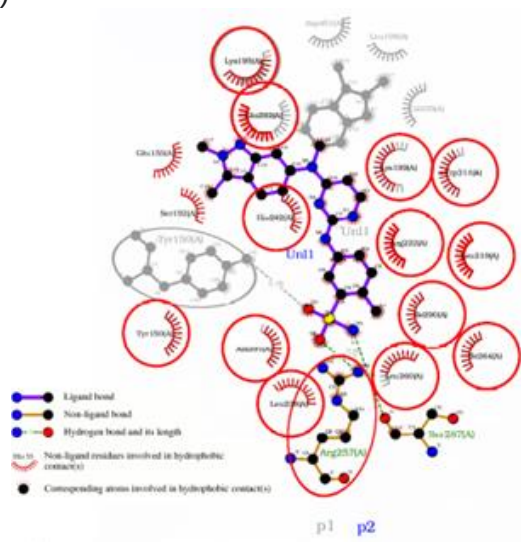
Os estudos teóricos de ancoragem molecular podem auxiliar na compreensão dos tipos de forças predominantes nas interações proteína-ligante, além de ajudar a identificar o sítio de ligação do fármaco nas biomacromoléculas. O estudo de ancoragem molecular neste capítulo levou em conta as interações da albumina e sua forma glicada com pazopanibe. Para este trabalho foram testados dois possíveis

sítios de ligação para identificar a melhor ancoragem do fármaco, localizados no sítio I e o sítio II (subdomínio IIIA) (Figura 54).

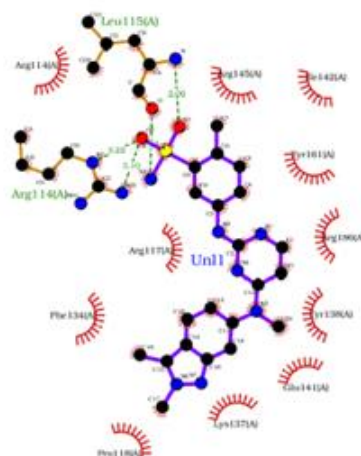
A partir das estruturas extraídas do Protein Data Bank (PDB), é identificável a presença de inúmeros sítios onde ocorre a glicação, única situação que diferencia a estrutura química de HSA e gHSA, como pode ser avistado na Figura 55(a). Além disso, como um recente trabalho verificou o sítio I (subdomínio IIA) como sítio de ligação de pazopanibe em HSA (KANDANDAPANI *et al.*, 2021), foi levada em conta a glicosilação do sítio em questão para análise das interações do fármaco com gHSA, mais especificamente no resíduo Lys-195.

Figura 54 - Gráfico das interações ligante-proteína para a ancoragem de Pazopanibe no sítio I A) HSA e C) gHSA e no sítio II para B) HSA e D) gHSA.

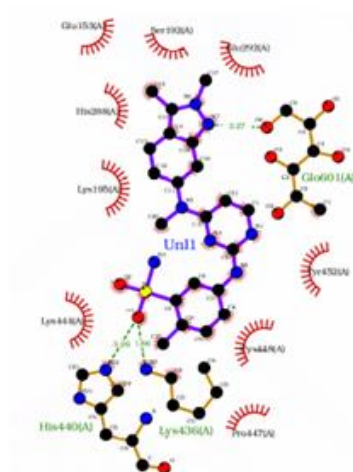
A)



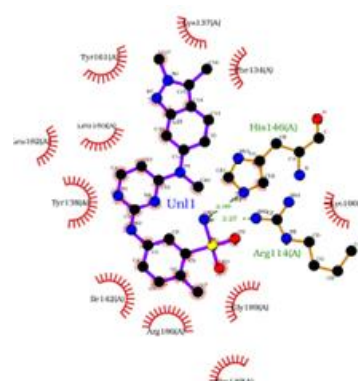
B)



C)



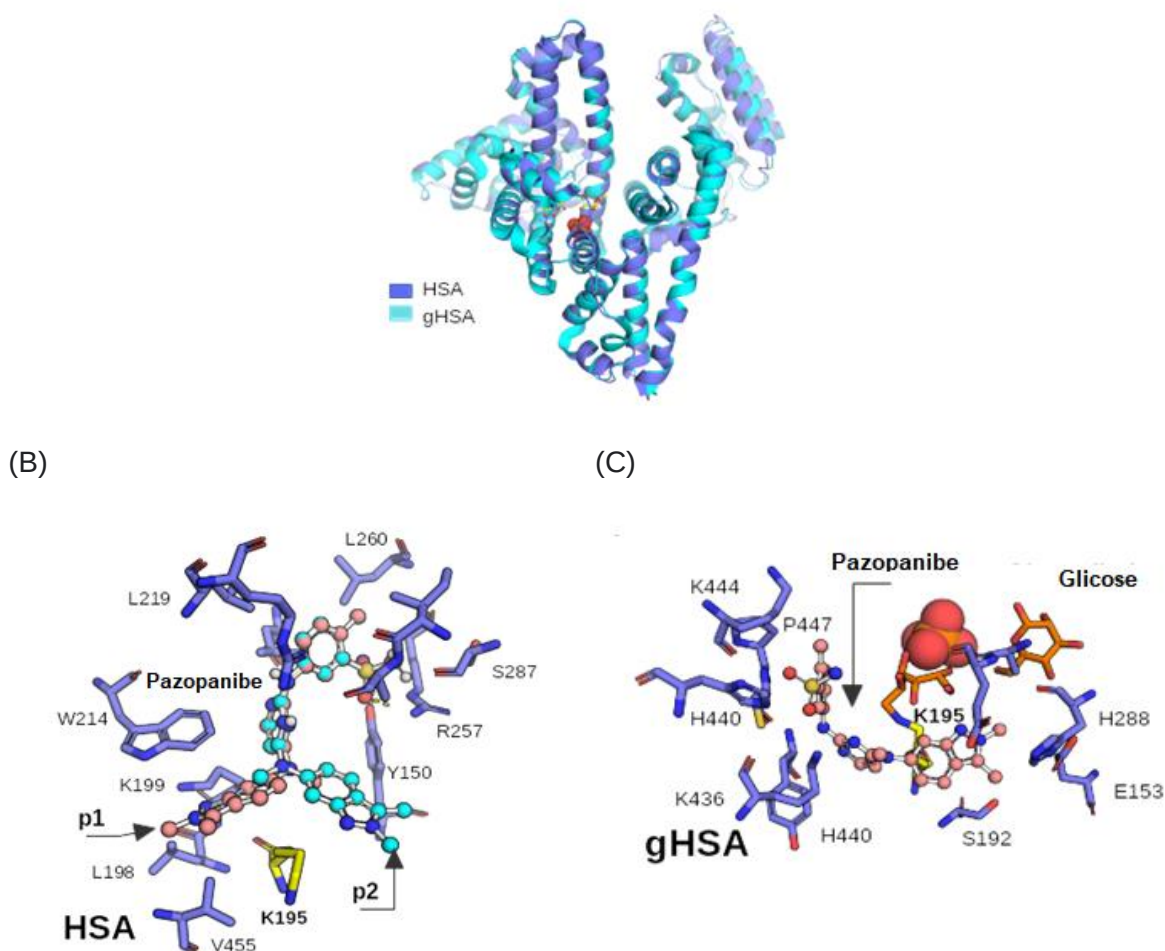
D)



Fonte: Modificado de MENEZES *et al.*, 2021.

No tocante às interações HSA-Pazopanibe, foram identificadas duas posições no sítio I onde pazopanibe apresentam a melhor pontuação, nomeados como p1 e p2. Tais posições diferem apenas do encaixe da base nitrogenada localizada extremidade oposta ao grupo da sulfonamida, como verificado na Figura 55(b). Por isso, a pontuação de mudança de energia livre calculada para as duas posições são extremamente semelhantes (-9,4 kcal/mol para p1 e -9,3 kcal/mol para p2).

Figura 55 - Sobreposição das estruturas de HSA (PDB id: 1AO6) e gHSA (PDB id: 4IW2)
(A). Melhores posições de ancoragem (p1, p2) de Pazopanibe no sítio de ligação I para HSA
(B) e gHSA (C).



Fonte: Modificado de MENEZES *et al.*, 2021.

É notada certa estabilidade do complexo formado proporcionado pelas interações hidrofóbicas, situação que reduz a exposição dos resíduos de aminoácidos que se encontram interagindo ao solvente. Observam-se as interações hidrofóbicas de pazopanibe com os resíduos Trp-214, Leu-219, Leu-260, Lys-195, Lys-199, Val-455 e Leu-198. Também são observadas a presença de ligações de hidrogênio por meio do grupo sulfonamida do fármaco através dos resíduos Tyr-150, Ser-287 e Arg-257. A priori, tendo em mãos apenas os resultados das interações de pazopanibe com HSA é possível supor a interferência da glicação proteica, tendo em vista que alguns resíduos de aminoácidos atuantes nestas interações são extremamente passíveis de sofrerem o processo de glicação, como por exemplo a lisina e arginina.

Com base na estrutura fornecida pelo PDB, o resíduo de aminoácido Lys-195, pertencente ao arcabouço proteico do sítio I se encontra glicado, havendo desta forma a diminuição de espaço para pazopanibe interagir com os resíduos deste sítio.

A melhor pontuação para ancoragem é de -9,4 kcal/mol, onde pazopanibe interage com bastante proximidade da região onde a glicose está presente, como observado na Figura 55(c). São identificadas interações hidrofóbicas entre pazopanibe e os resíduos Pro-447, Lys-444, His-288, Glu-153 e Ser-192. De forma adicional, são verificadas ligações de hidrogênio por meio dos resíduos Lys-436, His-440 e Ser-192. Além disso, a presença da glicação na albumina promoveu maior exposição do sítio I ao solvente durante as interações com pazopanibe.

Conforme visto nos resultados obtidos neste capítulo, pazopanibe não provocou fortes alterações na hidrofobicidade no micro ambiente pertencente ao resíduo de triptofano tanto da HSA quanto da gHSA, apesar de haver interação entre estes. Em contraponto, a região onde se encontra resíduos de tirosina da HSA sofreu modificações, situação justificada pelas interações de pazopanibe com aminoácidos envolvendo ligações de hidrogênio como Tyr-150. Para a gHSA não se evidenciaram interações semelhantes com resíduos de tirosina, corroborando com os dados experimentais observados na espectroscopia de fluorescência síncrona.

4 CONCLUSÃO

No Capítulo 2, os estudos de interação entre o Lapatinibe e Pazopanibe do TKI e o AChE foram realizados utilizando técnicas *in vitro* (espectroscopia) e estudos computacionais. Os ensaios enzimáticos demonstraram a inibição eficaz da AChE por drogas, sendo o Lapatinibe o mais potente na inibição deste alvo molecular. A supressão da fluorescência sugere que o mecanismo predominante é estático para as interações AChE-Pazopanibe e dinâmico para as interações AChE-Lapatinibe. As forças que governam as interações são hidrofóbicas no Lapatinibe. Em contraste, o Pazopanibe interage por meio das forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Os resultados do FRET confirmam o mecanismo estático das interações AChE-Pazopanibe. Os espectros de fluorescência síncrono e 3D sugerem mudanças conformacionais nas enzimas quando em contato com as drogas. Este estudo revelou aspectos moleculares das interações da enzima AChE com medicamentos de grande importância farmacológica e pode ser útil para futuros estudos de reposicionamento desses medicamentos para a doença de Alzheimer.

No Capítulo 3, os mecanismos de interação entre Pazopanibe e HSA não glicada e glicada foram elucidadas. Os parâmetros de afinidade de pazopanibe mostraram que o fármaco liga-se mais fortemente à forma glicada gHSA tanto em condições fisiológicas (310 K, pH 7,4), quanto nas demais temperaturas verificadas experimentalmente. A diferença nas interações está associada a presença de glicose nos sítios de ligação de pazopanibe, aumentando as interações observadas. Por fim, os resultados apresentados estabelecem a glicação de HSA como um fator crítico a ser examinado na avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos antitumorais.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, Mohamed A *et al.* Multi-Spectroscopic, thermodynamic and molecular dynamic simulation studies for investigation of interaction of dapagliflozin with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 264, p. 120298, 2022.
- ABRAMCZYK, Halina *et al.* Aberrant protein phosphorylation in cancer by using Raman biomarkers. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 2017, 2019.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, Snezana; KETTLE, Christine; MORTON, David W. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 106, p. 553–565, 2018.
- AHMAD, Mir Hilal; FATIMA, Mahino; MONDAL, Amal Chandra. Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: rational insights for the therapeutic approaches. **Journal of Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 59, p. 6–11, 2019.
- ALHOSSARY, Amr *et al.* Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 31, n. 13, p. 2214–2216, 2015.
- ALI, Rouchan; GUPTA, Ghanshyam Das; CHAWLA, Pooja A. Aducanumab: A new hope in Alzheimer's Disease. **Health Sciences Review**, [s. l.], p. 100039, 2022.
- ALMUTAIRI, Fahad M *et al.* Multi-spectroscopic and molecular docking technique study of the azelastine interaction with human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1201, p. 127147, 2020.
- AMEEN, Faisal *et al.* A detailed insight into the interaction of memantine with bovine serum albumin: A spectroscopic and computational approach. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 303, p. 112671, 2020.
- ANGUIZOLA, Jeanethe *et al.* Glycation of human serum albumin. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 425, p. 64–76, 2013.
- APAYDIN, Sinem; TÖRÖK, Marianna. Sulfonamide derivatives as multi-target agents for complex diseases. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, [s. l.], v. 29, n. 16, p. 2042–2050, 2019.
- ARAÚJO, Marlyete Chagas *et al.* Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 205, p. 213–226, 2018.
- ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SANTOS, V L dos A; GONSALVES, A A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
- ATTWOOD, Misty M *et al.* Soluble ligands as drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 695–710, 2020.
- AZVOLINSKY, Anna. Repurposing existing drugs for new indications. **The Scientist**, [s. l.], 2017.

BAJDA, Marek *et al.* Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 5608–5632, 2013.

BALLARD, Clive *et al.* Drug repositioning and repurposing for Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 661–673, 2020.

BAR-ON, P *et al.* Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. **Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 3555–3564, 2002.

BARTUS, Raymond T *et al.* The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, [s. l.], v. 217, n. 4558, p. 408–414, 1982.

BARUAH, Prayasee *et al.* Sulfonylurea class of antidiabetic drugs inhibit acetylcholinesterase activity: unexplored auxiliary pharmacological benefit toward Alzheimer's disease. **ACS pharmacology & translational science**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 193–205, 2021.

BASHA, Shaik Jeelan *et al.* New Flavone-Cyanoacetamide Hybrids with a Combination of Cholinergic, Antioxidant, Modulation of β -Amyloid Aggregation, and Neuroprotection Properties as Innovative Multifunctional Therapeutic Candidates for Alzheimer's Disease and Unraveling Their Mechan. **Molecular pharmaceuticals**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 2206–2223, 2018.

BERNARDI, Caroline C *et al.* Amplification and deletion of the ACHE and BCHE cholinesterase genes in sporadic breast cancer. **Cancer genetics and cytogenetics**, [s. l.], v. 197, n. 2, p. 158–165, 2010.

BERTRAND, Daniel; WALLACE, Tanya L. A review of the cholinergic system and therapeutic approaches to treat brain disorders. **Behavioral Pharmacology of the Cholinergic System**, [s. l.], p. 1–28, 2020.

BIRKETT, D J; MYERS, S P; SUDLOW, G. Effects of fatty acids on two specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular pharmacology**, United States, v. 13, n. 6, p. 987–992, 1977.

BOHNERT, Tonika; GAN, Liang-Shang. Plasma protein binding: from discovery to development. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 102, n. 9, p. 2953–2994, 2013.

BORTOLOTTI, Annalisa *et al.* On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra. **Rsc Advances**, [s. l.], v. 6, n. 114, p. 112870–112876, 2016.

BRAHMACHARI, Goutam. **Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products**. [S. l.]: Elsevier, 2017.

BROEKMAN, Fleur; GIOVANNETTI, Elisa; PETERS, Godefridus J. Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted?. **World journal of clinical oncology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 80, 2011.

CASE, David A *et al.* Amber 2020. [s. l.], 2020.

CASTANHO, Miguel A R B; PRIETO, Manuel J E. Fluorescence quenching data interpretation in biological systems: the use of microscopic models for data analysis and interpretation of complex systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, [s. l.], v. 1373, n. 1, p. 1–16, 1998.

CHELLAPPAN, Dinesh Kumar *et al.* The role of pazopanib on tumour angiogenesis and in the management of cancers: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 96, p. 768–781, 2017.

CHEN, Tingting *et al.* Investigation of the binding of Salvianolic acid B to human serum albumin and the effect of metal ions on the binding. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 645–652, 2011.

CHENG, Jing *et al.* Spectrofluorimetric and molecular docking studies on the interaction of cyanidin-3-O-glucoside with whey protein, β -lactoglobulin. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 105, p. 965–972, 2017.

CHOUDHARY, Muhammad Iqbal. **Drug design and discovery in Alzheimer's disease**. [S. l.]: Elsevier, 2015.

CHRISTEN, Yves. Oxidative stress and Alzheimer disease. **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 621S-629S, 2000.

CLEGG, R M. Fret and Flim Techniques. **Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol**, [s. l.], v. 33, p. 1–57, 2009.

COLOVIC, Mirjana B *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

CONGDON, Erin E; SIGURDSSON, Einar M. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 399–415, 2018.

COPELAND, Robert A; POMPLIANO, David L; MEEK, Thomas D. Drug–target residence time and its implications for lead optimization. **Nature reviews Drug discovery**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 730–739, 2006.

COSTA, Montserrat *et al.* Cross-sectional characterization of albumin glycation state in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients. **The journal of prevention of Alzheimer's disease**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 139–143, 2019.

CRISTOFANILLI, Massimo *et al.* A randomized phase II study of lapatinib+ pazopanib versus lapatinib in patients with HER2+ inflammatory breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, [s. l.], v. 137, n. 2, p. 471–482, 2013.

CUMMINGS, Jeffrey *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. e12295, 2022.

DA SILVA BARBOSA, Deyzi Caroline *et al.* Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory potential, in silico, of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg fruit peel essential oil. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 151, p. 112372, 2020.

DAVIS, Kenneth L; POWCHICK, Peter. Tacrine. **The Lancet**, [s. l.], v. 345, n. 8950, p. 625–630, 1995.

DE JONGE, Maja J A *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of pazopanib and lapatinib combination therapy in patients with advanced solid tumors. **Investigational new drugs**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 751–759, 2013.

DE SOUZA, Paula Rayane *et al.* Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea*

rhizophorae: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 197, p. 109–121, 2018.

DENG, Yanli *et al.* Bioavailability, metabolism and disposition of oral pazopanib in patients with advanced cancer. **Xenobiotica**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 443–453, 2013.

DETURE, Michael A; DICKSON, Dennis W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. **Molecular neurodegeneration**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–18, 2019.

DOUCHAMPS, Vincent; MATHIS, Chantal. A second wind for the cholinergic system in Alzheimer's therapy. **Behavioural pharmacology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 112–123, 2017.

DRAKE, Justin M; LEE, John K; WITTE, Owen N. Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 34, n. 10, p. 1722–1732, 2014.

DRENTH, Hans *et al.* The contribution of advanced glycation end product (AGE) accumulation to the decline in motor function. **European review of aging and physical activity**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016.

DU, Zhenfang; LOVLY, Christine M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. **Molecular cancer**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 58, 2018.

DUNN, Billy; STEIN, Peter; CAVAZZONI, Patrizia. Approval of Aducanumab for Alzheimer Disease—the FDA's Perspective. **JAMA internal medicine**, [s. l.], 2021.

FAISAL, Zelma *et al.* Probing the interactions of ochratoxin B, ochratoxin C, patulin, deoxynivalenol, and T-2 toxin with human serum albumin. **Toxins**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 392, 2020.

FAN, Yunchang *et al.* Interaction of an amino-functionalized ionic liquid with enzymes: a fluorescence spectroscopy study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 105, p. 297–303, 2013.

FATHI, Farzaneh *et al.* Kinetic and thermodynamic insights into interaction of albumin with piperacillin: Spectroscopic and molecular modeling approaches. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 296, p. 111770, 2019.

FERNÁNDEZ-BACHILLER, María Isabel *et al.* Novel tacrine– 8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties. **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 13, p. 4927–4937, 2010.

FOURNET, Maxime; BONTÉ, Frédéric; DESMOULIÈRE, Alexis. Glycation damage: a possible hub for major pathophysiological disorders and aging. **Aging and disease**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 880, 2018.

GABORA, Katalin *et al.* Current evidence on thyroid related adverse events in patients treated with protein tyrosine kinase inhibitors. **Drug Metabolism Reviews**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 562–569, 2019.

GADOMSKA, A V *et al.* Fluorescence from 3, 5-diphenyl-8-CF₃-BODIPYs with amino substituents on the phenyl rings: Quenching by aromatic molecules. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 254, p. 119632, 2021.

GAGALO, Iwona; RUSIECKA, Izabela; KOCIC, Ivan. Tyrosine Kinase Inhibitor as a new Therapy for Ischemic Stroke and other Neurologic Diseases: is there any Hope for a Better Outcome?. **Current neuropharmacology**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 836–844, 2015.

GARCÍA-DE LA PARRA, Luz María *et al.* Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Ecotoxicology and environmental safety**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 372–380, 2006.

GARCIA-RATÉS, Sara; GREENFIELD, Susan. Cancer and neurodegeneration: two sides, same coin?. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 14, p. 22307, 2017.

GAUTHIER, Serge. Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. **Cmaj**, [s. l.], v. 166, n. 5, p. 616–623, 2002.

GEHLEN, Marcelo H. The centenary of the Stern-Volmer equation of fluorescence quenching: From the single line plot to the SV quenching map. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [s. l.], v. 42, p. 100338, 2020.

GHOSH, Arun K; CÁRDENAS, Emilio L; OSSWALD, Heather L. The design, development, and evaluation of BACE1 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *In: ALZHEIMER'S DISEASE II*. [S. l.]: Springer, 2016. p. 27–85.

GIACOBINI, Ezio. The cholinergic system in Alzheimer disease. **Progress in brain research**, [s. l.], v. 84, p. 321–332, 1990.

GOLDIN, Alison *et al.* Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, [s. l.], v. 114, n. 6, p. 597–605, 2006.

GOTZ, Andreas W *et al.* Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized born. **Journal of chemical theory and computation**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 1542–1555, 2012.

GRIL, Brunilde *et al.* Pazopanib inhibits the activation of PDGFR β -expressing astrocytes in the brain metastatic microenvironment of breast cancer cells. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 182, n. 6, p. 2368–2379, 2013.

GUARINO, Angela *et al.* Executive functions in Alzheimer disease: a systematic review. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 10, p. 437, 2019.

GUZIOR, Natalia *et al.* Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. **Current medicinal chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 373–404, 2015.

HAREL, M *et al.* Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 90, n. 19, p. 9031–9035, 1993.

HASSAN, Nafisa M *et al.* Protein-ligand blind docking using QuickVina-W with inter-process spatio-temporal integration. **Scientific reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

HE, Zhuohao *et al.* Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. **Nature medicine**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 29–38, 2018.

HERNANDEZ, J Javier *et al.* Giving drugs a second chance: overcoming regulatory and financial hurdles in repurposing approved drugs as cancer therapeutics. **Frontiers in**

oncology, [s. l.], v. 7, p. 273, 2017.

HOLDGATE, Geoffrey A; MEEK, Thomas D; GRIMLEY, Rachel L. Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective. **Nature reviews Drug discovery**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 115, 2018.

HU, Yan-Jun *et al.* Interaction of colchicine with human serum albumin investigated by spectroscopic methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 122–126, 2005.

HUANG, Ling *et al.* Sunitinib, a clinically used anticancer drug, is a potent AChE inhibitor and attenuates cognitive impairments in mice. **ACS chemical neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 1047–1056, 2016.

IBERG, Niggi; FLÜCKIGER, R. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 261, n. 29, p. 13542–13545, 1986.

INESTROSA, Nibaldo C; DINAMARCA, Margarita C; ALVAREZ, Alejandra. Amyloid–cholinesterase interactions: implications for Alzheimer’s disease. **The FEBS journal**, [s. l.], v. 275, n. 4, p. 625–632, 2008.

JACK, Clifford R *et al.* Associations of amyloid, tau, and neurodegeneration biomarker profiles with rates of memory decline among individuals without dementia. **Jama**, [s. l.], v. 321, n. 23, p. 2316–2325, 2019.

JAISSON, Stéphane; GILLERY, Philippe. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification–derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. **Clinical chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 9, p. 1401–1412, 2010.

JAVIDNIA, Monica *et al.* Pazopanib reduces phosphorylated tau levels and alters astrocytes in a mouse model of tauopathy. **Journal of Alzheimer’s Disease**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 461–481, 2017.

JIANG, Qian-Qian. **Discovery of potent inhibitors of human β -tryptase by protein surface recognition**. [S. l.]: PhD Dissertation, 2013.

JIAO, Qinlian *et al.* Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. **Molecular cancer**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–12, 2018.

JOHNSON, G; MOORE, S W. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 217–225, 2006.

JOŃCZYK, Jakub *et al.* Dual Action of Dipyridothiazine and Quinobenzothiazine Derivatives—Anticancer and Cholinesterase-Inhibiting Activity. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 2604, 2020.

KABIR, Md Zahirul *et al.* Characterization of the binding of an anticancer drug, lapatinib to human serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 160, p. 229–239, 2016.

KANDANDAPANI, Salanee *et al.* Biomolecular interaction mechanism of an anticancer drug, pazopanib with human serum albumin: a multi-spectroscopic and computational approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], p. 1–12, 2021.

KANDIMALLA, Ramesh; REDDY, P Hemachandra. Therapeutics of neurotransmitters in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 1049–1069, 2017.

KARTHIKEYAN, Subramani *et al.* Understanding the binding information of 1-imino-1, 2-dihydropyrazino [1, 2-a] indol-3 (4H)-one in bovine serum albumin, 5-hydroxytryptamine receptor 1B and human carbonic anhydrase I: A biophysical approach. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 304, p. 112793, 2020.

KASZNICKI, Jacek; SLIWINSKA, Agnieszka; DRZEWOSKI, Józef. Metformin in cancer prevention and therapy. **Annals of translational medicine**, [s. l.], v. 2, n. 6, 2014.

KERKLAAN, B Milojkovic *et al.* Phase I and pharmacological study of pazopanib in combination with oral topotecan in patients with advanced solid tumours. **British journal of cancer**, [s. l.], v. 113, n. 5, p. 706–715, 2015.

KINNEY, Jefferson W *et al.* Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, [s. l.], v. 4, p. 575–590, 2018.

KOINIS, F *et al.* Second-line pazopanib in patients with relapsed and refractory small-cell lung cancer: a multicentre phase II study of the Hellenic Oncology Research Group. **British journal of cancer**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 8–14, 2017.

KONG, Yanyan *et al.* Pathological mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer's disease: the receptor for advanced glycation end products (RAGE). **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 12, p. 217, 2020.

KOSTELNIK, Adam; POHANKA, Miroslav. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by a plant secondary metabolite boldine. **BioMed research international**, [s. l.], v. 2018, 2018.

KRYGER, Gitay; SILMAN, Israel; SUSSMAN, Joel L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Structure**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 297–307, 1999.

KUMAR, Jitendra *et al.* Pyrimidine-Triazolopyrimidine and Pyrimidine-Pyridine Hybrids as Potential Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 736–747, 2018.

LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. [S. l.]: Springer Science & Business Media, 2013.

LANDRY, Yves; GIES, Jean-Pierre. Drugs and their molecular targets: an updated overview. **Fundamental & clinical pharmacology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–18, 2008.

LANOISELÉE, Hélène-Marie *et al.* APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. **PLoS medicine**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. e1002270, 2017.

LAZAREVIC-PASTI, Tamara *et al.* Modulators of Acetylcholinesterase Activity: From Alzheimer's Disease to Anti-Cancer Drugs. **Current medicinal chemistry**, [s. l.], v. 24, n. 30, p. 3283–3309, 2017.

LE GRAND, Scott; GÖTZ, Andreas W; WALKER, Ross C. SPFP: Speed without

compromise—A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. **Computer Physics Communications**, [s. l.], v. 184, n. 2, p. 374–380, 2013.

LEE, Joo-Hee *et al.* Natural Products Targeting Amyloid Beta in Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 2341, 2021.

LEHNINGER, A L; NELSON, D L; COX, M M. Princípios de bioquímica. 5ª edição. **São Paulo, BR, Sarvier**, [s. l.], 2011.

LEITE, CAVG *et al.* Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Rev. Bras. de Oncol. Clín.**, [s. l.], v. 8, n. 29, p. 130–142, 2012.

LI, Ping *et al.* Characterization of plasma protein binding dissociation with online SPE-HPLC. **Scientific reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.

LI, Daojin *et al.* Characterization of the baicalein–bovine serum albumin complex without or with Cu²⁺ or Fe³⁺ by spectroscopic approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 588–599, 2011.

LOPINA, Olga D. Enzyme inhibitors and activators. *In*: ENZYME INHIBITORS AND ACTIVATORS. [S. l.]: IntechOpen, 2017.

LORKE, Dietrich E; PETROIANU, Georg A. Reversible cholinesterase inhibitors as pretreatment for exposure to organophosphates. A review. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 101–116, 2019.

LUCAS, Laura H *et al.* Probing protein structure and dynamics by second-derivative ultraviolet absorption analysis of cation– π interactions. **Protein Science**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 2228–2243, 2006.

MACIĄŻEK-JURCZYK, Małgorzata *et al.* Alteration of human serum albumin binding properties induced by modifications: A review. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 188, p. 675–683, 2018.

MACIĄŻEK-JURCZYK, Małgorzata *et al.* The influence of oxidative stress on serum albumin structure as a carrier of selected diazaphenothiazine with potential anticancer activity. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 285, 2021.

MAKARSKA-BIALOKOZ, Magdalena; LIPKE, Agnieszka. Study of the binding interactions between uric acid and bovine serum albumin using multiple spectroscopic techniques. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 276, p. 595–604, 2019.

MANJUBAASHINI, N *et al.* Multispectroscopic and bioimaging approach for the interaction of rhodamine 6G capped gold nanoparticles with bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 183, p. 374–384, 2018.

MARCO-CONTELLES, José *et al.* Synthesis and pharmacology of galantamine. **Chemical reviews**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 116–133, 2006.

MARTIN, Ludovic; LATYPOVA, Xenia; TERRO, Faraj. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 458–471, 2011.

MARTINS, R.M.G. *et al.* Impact on cholinesterase-inhibition and in silico investigations of sesquiterpenoids from Amazonian Siparuna guianensis Aubl. **Spectrochimica Acta - Part A:**

Molecular and Biomolecular Spectroscopy, [s. l.], v. 252, 2021.

MARUCCI, Gabriella *et al.* Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, [s. l.], p. 108352, 2020.

MATTHEWS, Holly; HANISON, James; NIRMALAN, Niroshini. "Omics"-informed drug and biomarker discovery: opportunities, challenges and future perspectives. **Proteomes**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 28, 2016.

MAURYA, Neha *et al.* In vitro cytotoxicity and interaction of noscapine with human serum albumin: Effect on structure and esterase activity of HSA. **Molecular pharmaceutics**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 952–966, 2019.

MEERWALDT, Robbert *et al.* The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. **Cardiovascular Diabetology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2008.

MEIRA MENEZES, Thaís *et al.* Binding Mechanism between Acetylcholinesterase and Drugs Pazopanib and Lapatinib: Biochemical and Biophysical Studies. **ACS Chemical Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 24, p. 4500–4511, 2021.

MENEZES, Thais Meira *et al.* Effects of human serum albumin glycation on the interaction with the tyrosine kinase inhibitor pazopanib unveiled by multi-spectroscopic and bioinformatic tools. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 340, p. 116843, 2021.

MOKHTAR, Sara H *et al.* The Beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. **International journal of Alzheimer's disease**, [s. l.], v. 2013, 2013.

MONDAL, Moumita; KRISHNA, Ramadas; SAKTHIVEL, Natarajan. Molecular interaction between human serum albumin (HSA) and phloroglucinol derivative that shows selective anti-proliferative potential. **Journal of Luminescence**, [s. l.], v. 192, p. 990–998, 2017.

MONTENEGRO, M F *et al.* Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, [s. l.], v. 63, n. 18, p. 2175–2182, 2006.

MORRIS, Garrett M *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

MÜNCH, Gerald *et al.* Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. **Brain research reviews**, [s. l.], v. 23, n. 1–2, p. 134–143, 1997.

MUSA, Kabiru Abubakar *et al.* Intermolecular recognition between pyrimethamine, an antimalarial drug and human serum albumin: Spectroscopic and docking study. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 311, p. 113270, 2020.

MUTHYALA, Ramaiah. Orphan/rare drug discovery through drug repositioning. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, [s. l.], v. 8, n. 3–4, p. 71–76, 2011.

NAGAI, Ryoji *et al.* Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1–6, 2014.

NAVEENRAJ, Selvaraj; ANANDAN, Sambandam. Binding of serum albumins with bioactive

substances–nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [s. l.], v. 14, p. 53–71, 2013.

NGUYEN, Thuy Trang *et al.* Type 3 diabetes and its role implications in Alzheimer's disease. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 3165, 2020.

NGUYEN, Diana T; SHAYAH, Sepideh. Pazopanib: approval for soft-tissue sarcoma. **Journal of the advanced practitioner in oncology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 53, 2013.

OETTL, K; STAUBER, R E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 151, n. 5, p. 580–590, 2007.

PADHY, B M; GUPTA, Y K. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. **Journal of Postgraduate Medicine**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 153, 2011.

PANTZIARKA, Pan *et al.* Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—itraconazole as an anti-cancer agent. **Ecanermediscience**, [s. l.], v. 9, 2015.

PARVATHANENI, Vineela *et al.* Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 2076–2085, 2019.

PERUMCHERIL, Rebecca James. **Self Assessment and Review of Biochemistry**. [S. l.]: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Limited, 2015.

PETERS JR, Theodore. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. [S. l.]: Academic press, 1995.

PICK, Amy M; NYSTROM, Kelly K. Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. **Clinical therapeutics**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 511–520, 2012.

PIGNATARO, María Florencia; HERRERA, María Georgina; DODERO, Verónica Isabel. Evaluation of peptide/protein self-assembly and aggregation by spectroscopic methods. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 20, p. 4854, 2020.

POHANKA, Miroslav. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008–present). **Expert opinion on therapeutic patents**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 871–886, 2012.

POHANKA, Miroslav. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 4–16, 2015.

POÓR, Miklós *et al.* Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 170, p. 16–24, 2017.

POTTIER, Charles *et al.* Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 731, 2020.

PRASAD, Sonal; ZEUG, Andre; PONIMASKIN, Evgeni. Analysis of receptor–receptor interaction by combined application of FRET and microscopy. *In: METHODS IN CELL BIOLOGY*. [S. l.]: Elsevier, 2013. v. 117, p. 243–265.

RAMSAY, Rona R; TIPTON, Keith F. Assessment of enzyme inhibition: a review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1192, 2017.

RASBAND, Matthew N. Glial contributions to neural function and disease. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 355–361, 2016.

RICCIARELLI, Roberta; FEDELE, Ernesto. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind. **Current neuropharmacology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 926–935, 2017.

RONDEAU, Philippe; BOURDON, Emmanuel. The glycation of albumin: structural and functional impacts. **Biochimie**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 645–658, 2011.

ROPP, Patrick J *et al.* Gypsum-DL: an open-source program for preparing small-molecule libraries for structure-based virtual screening. **Journal of cheminformatics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–13, 2019.

ROSENBERRY, Terrone L *et al.* Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 2098, 2017.

ROSKOSKI JR, Robert. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 152, p. 104609, 2020.

ROSS, Philip D; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.

RUIZ-ESPEJO, Francisco *et al.* Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. **Breast cancer research and treatment**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 105–114, 2003.

RUIZ-ESPEJO, Francisco *et al.* Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 11–22, 2002.

RYAN, Qin *et al.* FDA drug approval summary: lapatinib in combination with capecitabine for previously treated metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. **The oncologist**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1114–1119, 2008.

SABBAGH, Marwan N. **Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline 2020**. [S. l.]: Springer, 2020.

SALEEM, Azeem *et al.* Lapatinib access into normal brain and brain metastases in patients with Her-2 overexpressing breast cancer. **EJNMMI research**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.

SALOMON-FERRER, Romelia *et al.* Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald. **Journal of chemical theory and computation**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 3878–3888, 2013.

SAMARI, Fayeze *et al.* Investigation of the interaction between amodiaquine and human serum albumin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling. **European journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 54, p. 255–263, 2012.

SANNAIKAR, M S; INAMDAR, Laxmi S; INAMDAR, Sanjeev R. Interaction between human serum albumin and toxic free InP/ZnS QDs using multi-spectroscopic study: An excellent alternate to heavy metal based QDs. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 281, p. 156–165, 2019.

SARAVANAN, Kandasamy *et al.* Binding studies of known molecules with

acetylcholinesterase and bovine serum albumin: A comparative view. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 259, p. 119856, 2021.

SARMAH, Sharat *et al.* Elucidation of molecular interaction of bioactive flavonoid luteolin with human serum albumin and its glycated analogue using multi-spectroscopic and computational studies. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 318, p. 114147, 2020.

SASAKI, Nobuyuki *et al.* Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 153, n. 4, p. 1149–1155, 1998.

SCHAFFERT, Larissa-Nele; CARTER, Wayne G. Do post-translational modifications influence protein aggregation in neurodegenerative diseases: A systematic review. **Brain sciences**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 232, 2020.

SEDMAK, J James; GROSSBERG, Sidney E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 79, n. 1–2, p. 544–552, 1977.

SELLEGOUNDER, Durai *et al.* Advanced glycation end products (AGEs) and its receptor, RAGE, modulate age-dependent COVID-19 morbidity and mortality. A review and hypothesis. **International immunopharmacology**, [s. l.], v. 98, p. 107806, 2021.

SERTKAYA, Aylin *et al.* Examination of clinical trial costs and barriers for drug development. **Report, US Department of Health and Human Services, Office of the Assistant Secretary for Planning and Evaluation, Washington, DC**, [s. l.], v. 7, 2014.

SHARMA, Kamlesh. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. **Molecular medicine reports**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 1479–1487, 2019.

SHEN, Guo-Feng *et al.* Spectroscopic and molecular docking studies of binding interaction of gefitinib, lapatinib and sunitinib with bovine serum albumin (BSA). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 153, p. 380–390, 2015.

SIDDIQUI, Sharmin *et al.* A comprehensive spectroscopic and computational investigation on the binding of the anti-asthmatic drug triamcinolone with serum albumin. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 4137–4151, 2019.

SIDDIQUI, Sharmin *et al.* Studying the interaction of drug/ligand with serum albumin. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 336, p. 116200, 2021.

SIES, Helmut. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 852, 2020.

ŠIMIĆ, Goran *et al.* Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. **Biomolecules**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 6, 2016.

ŠIMKOVÁ, Eva; STANĚK, David. Probing nucleic acid interactions and pre-mRNA splicing by Förster Resonance Energy Transfer (FRET) microscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 14929–14945, 2012.

SINGH, Varun Parkash *et al.* Advanced glycation end products and diabetic complications. **The Korean journal of physiology & pharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–14, 2014.

SINGH, Anju *et al.* Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 1583, 2019.

SINGH, Iqbal *et al.* Synthesis of 5-(4-(1H-phenanthro [9, 10-d] imidazol-2-yl) benzyldiene) thiazolidine-2, 4-dione as promising DNA and serum albumin-binding agents and evaluation of antitumor activity. **European journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 166, p. 267–280, 2019.

SINGH, Imocha Rajkumar; MITRA, Sivaprasad. Interaction of chlorpropamide with serum albumin: Effect on advanced glycated end (AGE) product fluorescence. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 206, p. 569–577, 2019.

SMITH, Mark A *et al.* Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 91, n. 12, p. 5710–5714, 1994.

SNEED, Gregory T *et al.* The role of Pazopanib in non-clear cell renal cell carcinoma: a systematic review. **Clinical genitourinary cancer**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 419–424, 2019.

STADLER, Richard H; STUDER, Alfred. Acrylamide formation mechanisms. **Acrylamide in Food Analysis, Content and Potential Health Effects; Gökmen, V., Ed**, [s. l.], p. 1–17, 2015.

STOLZING, Alexandra *et al.* Degradation of glycated bovine serum albumin in microglial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 1017–1027, 2006.

SU, Bo *et al.* Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 525–532, 2008.

SUDLOW, GDJB; BIRKETT, D J; WADE, D N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular pharmacology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1052–1061, 1976.

SUGIO, S *et al.* Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein engineering**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 439–446, 1999.

SURYAWANSHI, Vishwas D *et al.* Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of pharmaceutical analysis**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 56–63, 2016.

SYED, Moyeenuddin *et al.* Acetylcholinesterase supports anchorage independence in colon cancer. **Clinical & experimental metastasis**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 787, 2008.

SZKUDLAREK, A *et al.* Effects of non-enzymatic glycation in human serum albumin. Spectroscopic analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 152, p. 645–653, 2016.

SZKUDLAREK, Agnieszka; POŻYCKA, Jadwiga; MACIĄŻEK-JURCZYK, Małgorzata. Influence of Piracetam on Gliclazide—Glycated Human Serum Albumin Interaction. A Spectrofluorometric Study. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 111, 2019.

TAN, A R *et al.* Phase I study of weekly paclitaxel in combination with pazopanib and lapatinib in advanced solid malignancies. **British journal of cancer**, [s. l.], v. 110, n. 11, p. 2647–2654, 2014.

TAYYAB, Saad *et al.* Molecular interaction study of an anticancer drug, ponatinib with human

serum albumin using spectroscopic and molecular docking methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 214, p. 199–206, 2019.

TIWARI, Gaurav *et al.* Drug delivery systems: An updated review. **International journal of pharmaceutical investigation**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 2, 2012.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TZVETKOV, Nikolay T *et al.* Carboxamides vs. methanimines: crystal structures, binding interactions, photophysical studies, and biological evaluation of (indazole-5-yl) methanimines as monoamine oxidase B and acetylcholinesterase inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 179, p. 404–422, 2019.

VALASANI, Koteswara Rao *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: structure based design, synthesis, pharmacophore modeling, and virtual screening. **Journal of chemical information and modeling**, [s. l.], v. 53, n. 8, p. 2033–2046, 2013.

VAN TINE, Brian A; TRENT, Jonathan C. How we use pazopanib in treating soft-tissue sarcoma: experience at our multidisciplinary sarcoma centers. **Current medical research and opinion**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 623–629, 2019.

VARADARAJU, Kavitha Raj *et al.* Virtual screening and biological evaluation of piperazine derivatives as human acetylcholinesterase inhibitors. **International Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 2013, 2013.

VERHEIJEN, Remy B *et al.* Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of pazopanib: towards optimized dosing. **Clinical pharmacokinetics**, [s. l.], v. 56, n. 9, p. 987–997, 2017.

VERKHRATSKY, Alexei *et al.* Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 471, n. 10, p. 1247–1261, 2019.

VETTER, Stefan W. Glycated serum albumin and AGE receptors. **Advances in clinical chemistry**, [s. l.], v. 72, p. 205–275, 2015.

VIDAL, Cecilio J. Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. **Chemico-biological interactions**, [s. l.], v. 157, p. 227–232, 2005.

VITEK, Michael P *et al.* Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 91, n. 11, p. 4766–4770, 1994.

VOGEL, Jacob W *et al.* Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease. **Nature communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–15, 2020.

WALLACE, Andrew C; LASKOWSKI, Roman A; THORNTON, Janet M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein engineering, design and selection**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995.

WANAT, Karolina. Biological barriers, and the influence of protein binding on the passage of drugs across them. **Molecular biology reports**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 3221–3231, 2020.

WANG, Zhihong; COLE, Philip A. Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *In*: METHODS IN ENZYMOLOGY. [S. l.]: Elsevier, 2014. v. 548, p. 1–21.

WANI, Tanveer A *et al.* Study of binding interaction of rivaroxaban with bovine serum albumin using multi-spectroscopic and molecular docking approach. **Chemistry Central Journal**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017.

WARD, James E *et al.* A randomized, phase II study of pazopanib in castrate-sensitive prostate cancer: a University of Chicago Phase II Consortium/Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trials Consortium study. **Prostate cancer and prostatic diseases**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 87–92, 2012.

WILSON, James N *et al.* Binding-induced, turn-on fluorescence of the EGFR/ERBB kinase inhibitor, lapatinib. **Organic & biomolecular chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 17, p. 5006–5011, 2015.

WU, Di *et al.* Unravelling the binding mechanism of benproperine with human serum albumin: A docking, fluorometric, and thermodynamic approach. **European journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 146, p. 245–250, 2018.

XI, Hui-Jun *et al.* Role of acetylcholinesterase in lung cancer. **Thoracic cancer**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 390–398, 2015.

XUE, Hanqing *et al.* Review of drug repositioning approaches and resources. **International journal of biological sciences**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1232, 2018.

YAMASAKI, Keishi *et al.* Albumin–drug interaction and its clinical implication. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, [s. l.], v. 1830, n. 12, p. 5435–5443, 2013.

YANG, Yongliang *et al.* Computational discovery and experimental verification of tyrosine kinase inhibitor pazopanib for the reversal of memory and cognitive deficits in rat model neurodegeneration. **Chemical science**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 2812–2821, 2015.

YELLA, Jaswanth K *et al.* Changing trends in computational drug repositioning. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 57, 2018.

YIANNPOULOU, Konstantina G; PAPAGEORGIOU, Sokratis G. Current and future treatments in Alzheimer disease: an update. **Journal of central nervous system disease**, [s. l.], v. 12, p. 1179573520907397, 2020.

ZHANG, Di *et al.* Investigations of the molecular interactions between nisoldipine and human serum albumin in vitro using multi-spectroscopy, electrochemistry and docking studies. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 258, p. 155–162, 2018.

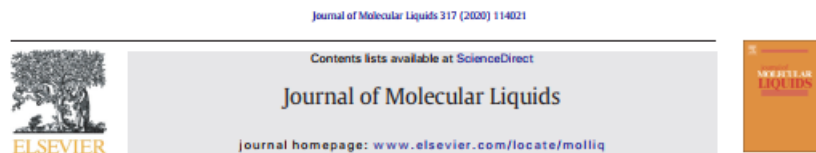
ZHAO, Jing *et al.* Targeting amyloidogenic processing of APP in Alzheimer's disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 13, 2020.

ZHOU, Junting *et al.* Rational design of multitarget-directed ligands: strategies and emerging paradigms. **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 20, p. 8881–8914, 2019.

ZSILA, Ferenc. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. **Molecular pharmaceuticals**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1668–1682, 2013.

ANEXO A – ARTIGOS DE PRIMEIRA AUTORIA PUBLICADOS

Artigo 1 - Insights on the interaction of furfural derivatives with BSA and HTF by applying multi-spectroscopic and molecular docking approaches



Insights on the interaction of furfural derivatives with BSA and HTF by applying multi-spectroscopic and molecular docking approaches

Thais Meira Menezes^a, Marcela Rodrigues Barros^a, Gustavo Tavares Ventura^b, Dartagnan de Sa Pires Ferreira^a, Adriane Regina Todeschini^b, Ronaldo Mohana Borges^b, Jefferson Luiz Principal^a, Gustavo Seabra^{a,1}, Jorge Luiz Neves^{a,*}

^a Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil
^b Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21945-970, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 24 May 2020
 Received in revised form 9 July 2020
 Accepted 7 August 2020
 Available online 10 August 2020

Keywords:
 Furfural
 Multi-spectroscopic
 Interactions
 BSA
 HTF

ABSTRACT

Furfural derivatives are present at high concentrations in many thermal processed foods. However, they are intensely known for their carcinogenic and genotoxic potential, being the impact of these compounds in a biological environment of paramount importance. Here, the interaction of the bovine serum albumin (BSA) and human transferrin (HTF) proteins with four furfural derivatives have been investigated. For this purpose, it has been used multi-spectroscopic methods together with theoretical tools. Results showed that Fur1 and Fur2 (keto derivatives) follow a dynamic mechanism for both proteins. Besides, the carboxyl derivative Fur3 suppressed the BSA and HTF fluorescence according to a static and dynamic mode, respectively. In contrast, the other carboxyl derivative Fur4 quenches the intrinsic fluorescence of both proteins according to a static mechanism. By one side, the best binder Fur4 attached very tightly to both proteins, while Fur3 has similar affinity to BSA as Fur4 but far less to HTF. On another side, Fur1 and Fur2 displayed weak affinities to BSA and also to HTF. Ultimately, the theoretical results of molecular docking revealed relevant aspects of favorite bind sites occupied by the furfural derivatives in the proteins.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

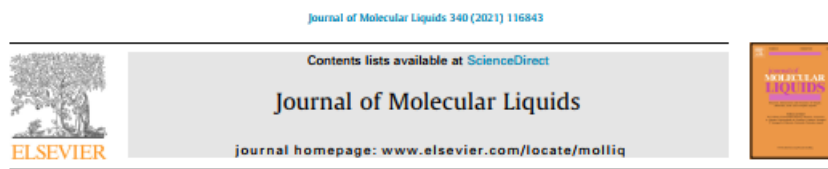
Furans are functional groups [1] that play an essential role in organic chemistry, being found in synthetic compounds, pharmaceuticals, tissues, cosmetics, and foods [2,3]. These compounds are formed from the furfural group and part of a substance group called Advanced Glycation End (AGEs) products. Furans are produced in large quantities during thermal processes in foods through the Maillard reaction or glycation [4]. As a non-enzymatic reaction, glycation occurs between amino acid residues of biomolecules, polyunsaturated fatty acids, or even ascorbic acid and carbonates from reducing sugars [5,6]. These degradation products originate from intermediate compounds called Amadori products, which, when dehydrated at low pH, lead to furfural derivatives [4,7], among other products. 2-acetylfuran is widely

reported as an example of furfural types generated by glycation in foods. This molecule contributes to the caramelized sweet-balsamic aroma [8–10] in bread [11] and industrialized baby foods [12]. This compound was described as a product in Maillard reactions between glycine/proline and glucose [13]. Furfural-acetone is also found naturally in foods such as coffee, and rum [14] and is used industrially as a nut flavoring agent and sweet spice aroma [15]. Besides, after the reaction of an intermediate furfural metabolite with the acetyl-coenzyme A, the 3-(2-furyl) acrylic acid presence was observed [16].

Despite its extensive use in the food industry, it is well-known that these substances can potentially be genotoxic and carcinogenic [17,18]. The presence of Amadori products in the blood plasma can provide many harmful effects to living systems. These compounds bind to various receptors on the cell membrane, preventing the cell from performing its functions [19]. Hence, the literature correlated the difficulty in controlling hyperglycemia in individuals with type 2 diabetes containing the plasma proteins transferrin, albumin, and fibrin modified by Amadori products [20]. The interaction process analysis between human plasma carrier proteins and substances exogenous to the organism is evaluated according to the proportion of the interaction strength. The higher the interaction between carrier proteins and exogenous compounds, the lower the compound distribution in the organs and tissues, and consequently, the lower the side effects of the presence of this

* Corresponding author.
 E-mail addresses: thais_m22@hotmail.com (T.M. Menezes), marcelarodriguesbarros@hotmail.com (M.R. Barros), gustavotventura@hotmail.com (G.T. Ventura), dartagnan_gpires@hotmail.com (D. de Sa Pires Ferreira), adritodeschini@bio.ufpr.br (A.R. Todeschini), mohana@bio.ufpr.br (R.M. Borges), principalj@yahoo.com.br (J.L. Principal), seabra@cop.ufed.br (G. Seabra), jorge.neves@ufpe.br (J.L. Neves).
¹ Department of Medicinal Chemistry and Center for Natural Products, Drug Discovery and Development (CNPDD), College of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA

Artigo 2 - Effects of human serum albumin glycation on the interaction with the tyrosine kinase inhibitor pazopanib unveiled by multi-spectroscopic and bioinformatic tools



Effects of human serum albumin glycation on the interaction with the tyrosine kinase inhibitor pazopanib unveiled by multi-spectroscopic and bioinformatic tools

Thaís Meira Menezes^a, Antônio Marinho da Silva Neto^b, Priscila Gubert^b, Jorge Luiz Neves^{a,*}

^aDepartamento de Química Fundamental, CCEN, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil
^bLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 29 March 2021
 Revised 22 June 2021
 Accepted 25 June 2021
 Available online 30 June 2021

Keywords:
 Pazopanib
 HSA
 gHSA
 Tyrosine kinase inhibitor
 Interactions

ABSTRACT

Human Serum Albumin (HSA) is the most abundant plasma transport protein in the human body. However, hyperglycemic conditions (as in diabetic patients) lead to glycated HSA (gHSA) formation, affecting many protein functionalities. Besides, diabetes is a well-known risk factor for various types of cancers, which turns the interactions of antitumoral drugs with gHSA into paramount relevance. In this view, this work focuses on the impact of the protein glycation in the binding of the drug Pazopanib (PAZO), a tyrosine kinase inhibitor used in antitumoral treatments) by applying multi-spectroscopic and theoretical techniques. Spectroscopic results reveal that PAZO quenches the HSA and gHSA intrinsic fluorescence following a static mechanism. On one side, PAZO presents a high and similar affinities for HSA ($K_d = 6.76 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) and gHSA ($K_d = 7.76 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) under low temperatures (296 K, pH 7.4). On another side, gHSA displayed less affinity to PAZO than HSA under physiological conditions (310 K, pH 7.4), indicating that gHSA presence can negatively affect drug distribution. Thermodynamic results indicate that HSA-PAZO interactions are governed by hydrophobic/Van der Waals forces and hydrogen bonds ($\Delta H^\circ < 0$ and $\Delta S^\circ > 0$). In contrast, only Van der Waals forces and hydrogen bonds ($\Delta H^\circ < 0$ and $\Delta S^\circ < 0$) predominate in the gHSA-PAZO interactions. FRET investigations attest to non-radioactive energy transfer between the drug and considered proteins. UV-Vis confirm the formation of the PAZO-HSA/gHSA complexes. Synchronous Fluorescence measurements show microenvironmental changes in HSA Tyr residues upon association with PAZO, while the gHSA microenvironment remains unchanged in the drug presence. Molecular docking studies suggest HSA glycosylation may have a relevant effect on PAZO binding modes. In summary, the evidence presented here puts HSA glycation as a crucial factor to be considered when evaluating pharmacokinetics and pharmacodynamics of antitumoral drugs.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pazopanib (5-[[4-[(2,3-Dimethyl-2H-indazol-6-yl) methylamino]-2-pyrimidinyl]amino] -2-methyl benzenesulfonamide) or PAZO (Fig. 1) is a medication applied as a tyrosine kinase inhibitor, which prevents the growth and proliferation of tumor cells [1]. With antiangiogenic action, this drug has inhibitory properties against various molecular targets, such as VEGFR-1, 2 and 3, PDGFR- α and β , FGFR-1 and 3, among others [1,2]. Due to these relevant properties, PAZO was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2009 to fight advanced renal cell cancer (RCC) [3], and in

2012 for advanced soft tissue sarcoma (STS) patients, previously treated with chemotherapy [4]. In addition, a series of clinical trial studies have been conducted with PAZO to treat the most diverse types of tumors [5–10], thus reinforcing its pharmacological importance.

Plasma proteins are essential tools for investigations involving drug absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME), given their role as drug carriers in the bloodstream [11]. Binding studies between drugs and biomacromolecules are highly relevant for understanding the mechanism of interaction of drugs in a biological environment [12,13]. Accordingly, interactions between drugs and plasma proteins play an essential role in pharmacokinetics and pharmacodynamic [14]. Strong interactions reduce drug availability to the molecular target, requiring higher doses and prolonging the drug's half-life. On the other hand, weak interactions hinder drug circulation in the body, preventing its therapeutic

* Corresponding author.

E-mail addresses: thaís_meira22@hotmail.com (T.M. Menezes), amarinho@prospecto.org (Antônio Marinho da Silva Neto), priskagubert@gmail.com (P. Gubert), jorge.l.neves@ufpe.br (J.L. Neves).

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116843>
 0167-7322/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Artigo 3 - Evaluation of europium-based carbon nanocomposites as bioimaging probes: Preparation, NMR relaxivities, binding effects over plasma proteins and cytotoxic aspects

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 628 (2021) 127250



Contents lists available at ScienceDirect
Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects
journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa



Evaluation of europium-based carbon nanocomposites as bioimaging probes: Preparation, NMR relaxivities, binding effects over plasma proteins and cytotoxic aspects

Thais Meira Menezes^{a,1}, Yarima Sanchez Garcia^{a,1}, Caio Rodrigo Dias de Assis^b, Gustavo Tavares Ventura^c, Rafaela Muniz de Queiroz^c, Wagner Barbosa Dias^c, Adriane Regina Todeschini^c, Jorge Luiz Neves^{a,1}

^a Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil

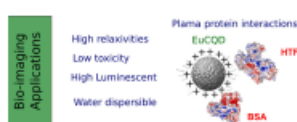
^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil

^c Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21944-970, RJ, Brazil

HIGHLIGHTS

- Water-dispersible Eu-based luminescent probes are essential for diverse biomedical applications.
- Europium-based carbon nanocomposites (EuCQD) have been synthesized and well-characterized.
- EuCQD displays hybrid luminescent properties and high NMR relaxivities.
- The nanocomposite presents very low toxicity against HBMEC, A549, and HT116 cells.
- Results expose EuCQD as an excellent bi-functional alternative to other lanthanide probes.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Protein
EuCQD
Interaction
Cytotoxicity
Europium

ABSTRACT

It is highly desirable to develop water-dispersible lanthanide-based luminescent probes with facile preparation, great bioavailability, and excellent photo properties for biomedical applications. Numerous carbon photoactive nanostructures (from diverse sources) have been reported for broad applications as surfactants, pollutants degradation, metal sensing and in vitro/in vivo bioimaging applications. Here, europium-based carbon nanocomposites (EuCQD) have been synthesized and well-characterized by their magneto-optical and biophysical properties. The obtained EuCQD is small in size (≈ 5 nm), highly water dispersible and composed essentially of carbon, europium and oxygen. Furthermore, the obtained nanocomposite presents Eu/CQD hybrid luminescent properties and high NMR relaxivities. The impact on biological media has been investigated based on plasma protein interactions and cytotoxicity assays. The results reveal that EuCQDs bind firmly ($K_a \approx 10^4$ – 10^5 M⁻¹) to studied plasma proteins (BSA and HTP) mainly by Van der Waals interaction and hydrogen bonds. Furthermore, protein CD spectra reveal that both proteins experience structural changes during EuCQD interaction, and the

* Corresponding author.

E-mail addresses: thais_mneira22@hotmail.com (T.M. Menezes), ysanchez10@gmail.com (Y.S. Garcia), caiodias2@hotmail.com (C.R. Dias de Assis), gustavoventura@hotmail.com (G.T. Ventura), mmunizq@gmail.com (R.M. de Queiroz), wldias1976@gmail.com (W.B. Dias), adrianes@biof.ufjf.br (A.R. Todeschini), jorge.lneves@ufpe.br (J.L. Neves).

¹ Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127250>

Received 19 May 2021; Received in revised form 17 July 2021; Accepted 24 July 2021

Available online 27 July 2021

0927-7757/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Artigo 4 – Binding Mechanism between Acetylcholinesterase and Drugs Pazopanib and Lapatinib: Biochemical and Biophysical Studies

* Unknown * | ACSJCA | JCA11.2.5208/W Library-044 | manuscript.3f (R5.1.3.5000 | 2.1) 2021/07/12 08:51:00 | PROCS-WS-120 | en_5014524 | 11/19/2021 10:35:50 | 12 | JCA-DEFAULT

ACS Chemical
Neuroscience

pubs.acs.org/chemneuro

Research Article

1 Binding Mechanism between Acetylcholinesterase and Drugs 2 Pazopanib and Lapatinib: Biochemical and Biophysical Studies

3 Thaís Meira Menezes, Caio Assis, Alcides Jairon Lacerda Cintra, Roberto Carlos Silva dos Santos,
4 Wilka Karla Martins do Vale, Regildo Max Gomes Martins, Ranilson de Souza Bezerra,
5 Gustavo de Miranda Seabra, Chenglong Li, and Jorge Luiz Neves*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00521>

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are antitumor compounds that prevent the phosphorylation of proteins in a biological environment. However, the multitarget performance of TKIs promotes them as possible candidates for drug repositioning. In this work, interaction and inhibition studies through spectroscopic and computational techniques to evaluate the binding effectiveness of lapatinib and pazopanib TKIs to acetylcholinesterase (AChE) are reported. The results indicated potent inhibition at the μM level. The types of inhibition were identified, with pazopanib acting through non-competitive inhibition and lapatinib through acompetitive inhibition. The fluorescence suppression studies indicate a static mechanism for lapatinib–AChE and pazopanib–AChE systems, with a binding constant in the order of 10^5 M^{-1} . The obtained thermodynamic parameters reveal interactions driven by van der Waals forces and hydrogen bonds in the lapatinib–AChE system (ΔH° and $\Delta S^\circ < 0$). In contrast, the pazopanib–AChE system shows positive ΔH° and ΔS° , characteristic of hydrophobic interactions. The Foster resonance energy transfer study supports the fluorescence studies performed. The 3D fluorescence studies suggest changes in the microenvironment of the tryptophan and tyrosine residues of the protein in contact with lapatinib and pazopanib. The results suggest effective inhibition and moderate interaction of the drugs with AChE, making them interesting for conducting more in-depth repositioning studies as AChE inhibitors.

KEYWORDS: fluorescence quenching, pazopanib, lapatinib, TKI inhibitors, acetylcholinesterase, enzyme inhibition, interactions

1. INTRODUCTION

The acetylcholinesterase (AChE) enzyme has a unique role in neuronal signaling, considering its catalytic function acting on the neurotransmitter acetylcholine (ACh) hydrolysis, directly interfering with the transmission of nerve impulses in the brain.¹ Besides its importance in cholinergic functions, AChE also influences the cell differentiation, proliferation, and adhesion;² amyloid protein deposition in organs;³ apoptosis;⁴ and the formation of tumors.⁵ The mechanisms involved in developing neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) are not clearly understood. However, the theory most explored by researchers developing AD drugs focuses on the cholinergic hypothesis, ACh deficiency in the nervous system.^{6,7} Although studies on AD involve different proteins, possible therapeutic molecular targets, all drugs currently approved for AD control have been developed focusing on AChE inhibition,^{1,8} and the only exception being the recent FDA approval of aducanumab (Aduhelm-Biogen), the first approved drug to explore the amyloid hypothesis.⁹ Apart from aducanumab, there are currently only five approved drugs for

AD treatment, and 121 are undergoing clinical trials, among which 52 are repositioned drugs.¹⁰

Research on the discovery of multitarget drugs is growing, both in design and development and in understanding the molecular mechanism behind the therapeutic effect.^{11,12} A series of antitumor drugs with assorted molecular targets have been found to have the power to inhibit AChE,¹³ highlighting the relationship between cancer and this enzyme.¹⁴ The performance of protein tyrosine kinases—enzymes targeted by antitumor compounds—is also reported in the literature of drug development for neurodegenerative diseases,¹⁵ where, in studies for the treatment of AD, tyrosine kinase inhibitory molecules (TKIs) showed a neuroprotective effect¹⁶ in

Received: August 3, 2021

Accepted: November 11, 2021

ACS Publications

© XXXX American Chemical Society

A

<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00521>
ACS Chem. Neurosci. XXXX, XXX, XXX–XXX