

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DOS PARÂMETROS  
CINÉTICOS DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE  
CEREBRAL DE RATOS FRENTE A ALGUNS  
COMPOSTOS AZÓIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Jonas Daci da Silva Serres**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DOS PARÂMETROS CINÉTICOS  
DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL DE  
RATOS FRENTE A ALGUNS COMPOSTOS AZÓIS**

**por**

**Jonas Daci da Silva Serres**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

**Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch  
Co-orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA  
ENZIMA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL DE RATOS FRENTE  
A ALGUNS COMPOSTOS AZÓIS**

elaborada por  
**Jonas Daci da Silva Serres**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**



---

**Prof. Dra. Vera Maria Melchior Morsch**  
(Presidente/Orientadora)



---

**Prof. Dra. Margarete Dulce Bagatini (UFFS)**



---

**Prof. Dr. Nilo Zanatta (UFSM)**

Santa Maria, 09 de setembro de 2011.

*“Acreditar é monótono, duvidar é apaixonante, manter-se alerta: eis a vida!”*

*Oscar Wilde*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha mãe, Maria Amélia, a pessoa que mais acredita no que eu sou capaz, por mais esta etapa encerrada em minha vida. A ela dedico não só este trabalho, mas sim todo o amor e carinho que ela merece. Mãe, não seria o mesmo sem teus ensinamentos, sem tua fé, sem teu amor. Obrigado por tudo.

A minhas irmãs, Eunice e Melânia por confiarem na minha capacidade e pelo carinho, afinal, eu não conquistaria nada sem o afeto de vocês.

A minha orientadora, Professora Vera Morsch, pela oportunidade, pela compreensão, pela objetividade, pelo carinho e respeito com que sempre me tratou. Professora, meu muito obrigado por todos esses três anos de orientação.

À professora Maria Rosa pela co-orientação e pelos ensinamentos passados ao longo dos anos.

Às professoras Paula Maldonado e Rosélia Spanevelo pelos ótimos momentos de convivência e por tudo que aprendi com vocês.

Aos meus inúmeros colegas de laboratório, em especial àqueles com quem dividi não apenas as dosagens de proteínas, mas sim, as alegrias, as dificuldades, e sim vou citar nomes, em especial os de Roberta, Andréia, Fátima, Dani, Carol, Helo, Juci, Juliano, Jessié. Naia, Gustavo, Victor e Lu, que em suas particularidades não me ensinaram somente técnicas laboratoriais e sim o valor do respeito.

Ao meu IC e companheiro de acetil Eduardo, por toda a ajuda e competência dedicada à realização deste trabalho.

Ao professor Nilo Zanatta por aceitar o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À professora Margarete, que sempre vou considerar Marga, por todo o apoio que sempre dispensou a mim e também por aceitar ser banca examinadora dessa dissertação.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq e FAPERGS.

E por fim, à grande surpresa que tive nesse mestrado, a pessoa que não só demonstrou afinidades, nem semelhanças, mas que se mostrou uma irmã por opção, a companheira, a parceira de madrugadas a fio preparando um seminário, de

tardes inteiras passadas num café discutindo sobre os dilemas existenciais ou torrando a bolsa, a amiga Amanda, agradeço por tudo o que representou pra mim, por toda a amizade e companheirismo dedicados a mim todo esse tempo, muito obrigado e Curitiba que nos aguarde.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO, *IN VITRO*, DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL DE RATOS FRENTE A ALGUNS COMPOSTOS AZÓIS**

AUTOR: JONAS DACI DA SILVA SERRES

ORIENTADORA: VERA MARIA MELCHIORS MORSCH

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de setembro de 2011.

A enzima acetilcolinesterase é responsável pela hidrólise de acetilcolina na fenda sináptica durante a transmissão do impulso nervoso. A investigação de novos inibidores dessa importante enzima é de grande relevância na tentativa de minimizar os efeitos causados por danos na transmissão colinérgica, principalmente em patologias como a doença de Alzheimer. Frente a isto, este trabalho investigou o potencial inibitório de diferentes classes de compostos heterocíclicos (pirazóis, isoxazóis e isoxazolinonas), *in vitro*, sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase de diferentes estruturas cerebrais de ratos (córtex, estriado e hipocampo). Dos onze compostos testados, apenas o denominado aqui como **2c**, foi o único a não apresentar inibição significativa da enzima em nenhuma estrutura testada; todos os dez compostos restantes apresentaram inibição significativa ( $p < 0,05$ ), sendo que os compostos **2a** e **3c**, por possuírem maior eficácia inibitória (53 e 59%, respectivamente) foram os compostos selecionados para os ensaios de cinética enzimática. A partir destes ensaios foi possível a caracterização dos parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{MÁX}$ ) e do tipo de inibição apresentada por cada composto através da plotagem dos dados em gráficos de Lineweaver-Burk e Cornish-Bowden, sendo que os parâmetros citados encontrados para o composto **2a** foram:  $K_m = 0,2$  mM e  $V_{MÁX} = 7,94$   $\mu$ moles ASCh/h/mg de proteína. O composto apresentou inibição competitiva com um  $K_i = 1,46$  mM. Já o composto **3c** apresentou valores de  $K_m$  e  $V_{MÁX}$  iguais a 0,05 mM e 1,42  $\mu$ moles ASCh/h/mg de proteína, respectivamente. A inibição exercida por este composto foi do tipo não-competitiva com  $K_i = 2,2$  mM. Todos os compostos foram diluídos em metanol PA, nas concentrações de 0,031; 0,062; 0,125; 0,250 e 0,500 mM. Os compostos selecionados para os ensaios de cinética enzimática foram diluídos também em metanol PA, nas concentrações de 0,125; 0,250; 0,500 e 1,0 mM.

*Palavras-chave:* acetilcolinesterase; cinética; heterocíclicos; inibição

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Post-Graduate Program in Biological Sciences – Toxicological  
Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### ***IN VITRO* EVALUATION OF THE KINETIC PARAMETERS OF THE CEREBRAL ACETYLCHOLINESTERASE ENZYME FROM RATS FACE TO SOME AZOLIC COMPOUNDS**

AUTHOR: JONAS DACI DA SILVA SERRES

ADVISOR: VERA MARIA MELCHORS MORSCH

Date and Place of the Defense: Santa Maria, September, 9<sup>th</sup>, 2011.

The acetylcholinesterase enzyme is responsible for the acetylcholine hydrolysis in the synaptic cleft during the transmission of nervous impulse. The investigation of new inhibitors of this important enzyme is very relevant on tentative to minimize the effects due damages on cholinergic transmission, mainly in pathologies as Alzheimer's disease. Therefore, this work has investigated the inhibitory potencial of different classes of heterocyclic compounds (pyrazole, isoxazole and isoxazolinone), *in vitro*, on the acetylcholinesterase activity on different cerebral structures of rats (cortex, striatum and hippocampus). Among all tested compounds, only the **2c** compound did not show any inhibition; all the remaining compounds showed significative inhibition ( $p < 0,05$ ), and the compounds **2a** and **3c**, that shown the best inhibitory efficacy (51 and 59 %, respectively), were the compounds selected to the kinetic enzymatic assays. From these results it was possible to characterize the kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{MAX}$ ) and the inhibition type showed by every compound through the Lineweaver-Burk and Cornish-Bowden plots. The mentioned parameters to the compound **2a** were  $K_m = 0.2$  mM and  $V_{MAX} = 7.94$   $\mu$ moles ASCh/h/mg of protein. The compound exhibited a competitive inhibition type with  $K_i = 1.46$  mM. To the compound **3c**, the values of  $K_m$  and  $V_{MAX}$  were 0.05 and 1.42  $\mu$ moles ASCh/h/mg of protein, respectively. This compound performed a noncompetitive inhibition type with  $K_i = 2.2$  mM. All the compounds were previously diluted in methanol PA in concentrations of 0.031 mM, 0.0625 mM, 0.125 mM, 0.250 mM and 0.500 mM. The inhibitors selected to the kinetic assays were also diluted in methanol PA in the concentrations of 0.125, 0.250, 0.500 and 1.0 mM.

*Keywords:* acetylcholinesterase; heterocyclic; inhibition; kinetic



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1. Enzimas e transportadores colinérgicos. Adaptado de Rand (2007).....	19
FIGURA 2. Estrutura 3D da TcAChE. Adaptado de Dvir, 2010.....	21
FIGURA 3. Visão esquemática do canal de acesso ao sítio-ativo da TcAChE. Adaptado de Dvir, 2010.....	22
FIGURA 4. Acetilcolinesterase. <b>a)</b> Características estruturais da enzima. <b>b)</b> hidrólise da acetilcolina por AChE. Adaptado de Soreq & Seidman,(2001).....	23
.FIGURA 5. Produtos protéicos alternativos do gene de AChE. Adaptado de zimmerman & Soreq (2006).....	24
FIGURA 6. Modelo estrutural da TcAChE com potencial eletrostático sobreposto.. Adaptado de Dvir, 2010.....	25
FIGURA 7. Mecanismo de hidrólise da AChE – ataque nucleofílico.....	26
FIGURA 8. Mecanismo de hidrólise da AChE – catálise básica.....	26
FIGURA 9. Mecanismo de hidrólise da AChE – catálise ácida.....	27
FIGURA 10. Mecanismo de hidrólise da AChE – ataque nucleofílico da água.....	27
FIGURA 11. Mecanismo de hidrólise da AChE – catálise básica.....	28
FIGURA 12. Mecanismo de hidrólise da AChE – catálise ácida.....	28
FIGURA 13. Mecanismo de hidrólise da AChE – restauração do sítio-ativo.....	29
FIGURA 14. Representação esquemática da interação bioquímica entre OPs e AChE. Adaptado de Costa (2006).....	34
FIGURA 15. Tacrina.....	35
FIGURA 16. Donepezil.....	36
FIGURA 17. Rivastigmina.....	36

FIGURA 18. Metrifonato.....	37
FIGURA 19. Galantamina.....	38
FIGURA 20. Fisostigmina.....	39
FIGURA 21. Fenserina.....	39
FIGURA 22. Ganstigmina.....	40
FIGURA 23. Huperzina.....	41
FIGURA 24. Estrutura do anel pirazol.....	42
FIGURA 25. Estrutura do anel isoxazol.....	43
FIGURA 26. Estrutura do anel isoxazolinona.....	45

## MANUSCRITO

FIGURE 1- Chemical structures of the tested compounds. 1a, 1b, 1c and 1d are pyrazoles; 2a, 2b, 2c and 2d are isoxazoles; 3a, 3b and 3c are isoxazolinones.....	72
FIGURE 2- Lineweaver-Burk plots for compound 2a on AChE activity from striatum of rats (A) or <i>Electrophorus electricus</i> (B). $1/V_{max}$ versus $1/[\text{acetylthiocholine}]$ in the presence of various concentrations of inhibitor: ( $\blacktriangle$ ) 0 $\mu\text{M}$ , ( $\bullet$ ) 125 $\mu\text{M}$ , ( $\blacklozenge$ ) 250 $\mu\text{M}$ , (+) 500 $\mu\text{M}$ , ( $\blacksquare$ ) 1000 $\mu\text{M}$ .....	73
FIGURE 3- Cornish – Bowden plots for compound 2a on AChE activity from striatum of rats (A) or <i>Electrophorus electricus</i> (B). $1/[3\text{-methyl-5-phenyl-isoxazole}]$ versus $[\text{acetylthiocholine}]/v$ in the presence of various concentrations of substrate: ( $\blacktriangle$ ) 0.01 mM, ( $\bullet$ ) 0.1 mM, ( $\blacklozenge$ ) 0.5 mM, (+) 1 mM.....	73-74
FIGURE 4- Lineweaver-Burk plots for compound 3c on AChE activity from cerebral cortex of rats (A) or <i>Electrophorus electricus</i> (B). $1/V_{max}$ versus $1/[\text{acetylthiocholine}]$ in the presence of various concentrations of inhibitor: ( $\blacktriangle$ ) 0 $\mu\text{M}$ , ( $\bullet$ ) 125 $\mu\text{M}$ , ( $\blacklozenge$ ) 250 $\mu\text{M}$ , (+) 500 $\mu\text{M}$ , ( $\blacksquare$ ) 1000 $\mu\text{M}$ .....	74
FIGURE 5- Cornish – Bowden plots for compound 3c on AChE activity from cerebral cortex of rats (A) or <i>Electrophorus electricus</i> (B). $1/[3\text{-(p-methoxy)-phenyl-5-isoxazolinone}]$ versus $[\text{acetylthiocholine}]/v$ in the presence of various concentrations of substrate: ( $\blacktriangle$ ) 0.01 mM, ( $\bullet$ ) 0.1 mM, ( $\blacklozenge$ ) 0.5 mM, ( $\blacksquare$ ) 1 mM. The value of $K_i$ constant may be determined easily on the graphs to a noncompetitive inhibition.....	75

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1. Características farmacológicas de alguns AChEIs.....34

### MANUSCRITO

TABLE I. Nomenclature of the tested compounds.....69

TABLE II. AChE activity in the presence of the pyrazole, isoxazole and isoxazolinone compounds in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of the rats measured at various concentrations.....69

TABLE III.  $K_m$  and  $V_{max}$  values for AChE activity from different sources in the presence of the compounds **2a** and **3c**.....71

TABLE IV.  $K_i$  and  $IC_{50}$  values for **2a** and **3c** compounds on inhibition of AChE activity.....71

## LISTA DE ABREVIações

AD – Doença de Alzheimer

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

*EeAChE* – Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus*

*TcAChE* – Acetilcolinesterase de *Torpedo californica*

AChEI – Inibidor de acetilcolinesterase

ATP – Adenosina trifosfato

BuChE – Butirilcolinesterase

CB – Carbamato

ChAT – Colina acetiltransferase

ChT – Transportador de colina

ColQ – Colágeno Q

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FDA – U.S. Food and drugs administration

HACHT – Transportador de alta afinidade à colina

HupA – Huperzina A

mACHR – Receptores de acetilcolina muscarínicos

nACHR – Receptores de acetilcolina nicotínicos

OP – Organosfosforado

PAS – Sítio aniônico periférico

PRiMA – Âncora de membrana rica em prolina

SNC – Sistema nervoso central

VACHT – Transportador de acetilcolina vesicular

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	11
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES</b> .....	12
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1. Objetivos</b> .....	18
1.1.1. Objetivo geral.....	18
1.1.2. Objetivos específicos.....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
<b>2.1. Sistema colinérgico</b> .....	19
2.1.1. Acetilcolinesterase.....	20
2.1.2. Estrutura da AChE.....	21
2.1.3. Mecanismo de hidrólise da AChE.....	26
<b>2.2. Histórico dos inibidores da AChE</b> .....	31
2.2.1. Organofosforados e carbamatos.....	31
2.2.2. Inibidores de uso terapêutico.....	33
2.2.3. Classes de inibidores terapêuticos da AChE.....	34
<b>2.3. Compostos heterocíclicos — pirazóis, isoxazóis e isoxazolinonas</b> .....	43
2.3.1. Pirazóis.....	43
2.3.2. Isoxazóis e isoxazolinonas.....	44
<b>3. MANUSCRITO</b> .....	47
<b>3.1. Manuscrito</b> .....	48
Kinetic analysis of inhibition of some azoles compounds on acetylcholinesterase activity from rats brain.....	48

<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, que se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão de Literatura, Discussão e Conclusões desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para a qual será submetido:

Manuscrito – Cell Biology and Toxicology

## 1. INTRODUÇÃO

Pesquisas envolvendo a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) têm sido objeto de estudo desde o surgimento da hipótese colinérgica, em que déficits de aprendizado, memória e comportamento parecem estar associados com perda da neurotransmissão colinérgica em hipocampo e córtex cerebral (KLAFKI et al, 2006). Embora várias novas opções terapêuticas promissoras estejam sendo pesquisadas, a descoberta de novos inibidores da acetilcolinesterase permanece na atual fronteira terapêutica para o tratamento da doença de Alzheimer (DA), (GELDMACHER et al, 2006). A DA é a forma mais comum de dano cognitivo na terceira idade e o aumento de sua prevalência reflete o crescimento da população de idosos (CASELLI et al, 2006).

Inibidores de AChE usados para tratar DA incluem tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina. A tacrina foi o primeiro inibidor de AChE aprovado para o tratamento da AD (CRISMAN et al, 1994), mas esse fármaco tem sido relacionado a alguns efeitos colaterais graves como hepatotoxicidade, o que conduz á necessidade de mais pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novos inibidores com melhor especificidade e maior potência. Hoje em dia, os inibidores de AChE comumente administrados incluem a rivastigmina, o donepezil e a galantamina. Entre esses a galantamina possui o duplo mecanismo de inibição da AChE e modulação alostérica de receptores nicotínicos de acetilcolina (SAMOCHOCKI et al, 2003).

Há diferentes tipos de colinesterases em humanos, que diferem por sua localização nos tecidos, afinidade pelo substrato e funções fisiológicas. As principais dessas colinesterases são a acetilcolinesterase, encontrada no sistema nervoso e também presente em outras membranas de eritrócitos, e a butirilcolinesterase (BuChE), que é uma enzima presente no plasma, fígado, fluído cérebro-espinhal e células gliais (JOKANOVIC et al, 2009). Sob condições fisiológicas normais, a AChE atua na quebra de acetilcolina (ACh), que é o mediador químico responsável pela condução de impulsos nervosos em sítios de transmissão colinérgica. Entretanto, seu papel fisiológico no sangue ainda não está compreendido.



A função da AChE é o término da ação da ACh na junção de vários nervos colinérgicos terminais com seus órgãos efetores ou sítios pós-sinápticos. Compostos organofosforados (OP) e carbamatos (CB) são os mais importantes inibidores da AChE e são frequentemente chamados de anticolinesterases. Na presença de inibidores a AChE torna-se progressivamente inibida e não é mais capaz de hidrolisar ACh em colina e ácido acético (JOKANOVIC et al, 1997). Conseqüentemente, a ACh acumula-se nos sítios de receptores colinérgicos e produz efeitos equivalentes a estimulação excessiva de receptores colinérgicos por todo o sistema nervoso central e periférico.

Tanto substrato, quanto inibidores (CB e OP) reagem covalentemente com as esterases essencialmente da mesma maneira: pela acetilação do resíduo serina do sítio catalítico da AChE, que é análoga à fosforilação e carbamilação. Em contraste à enzima acetilada que rapidamente separa ácido acético e restaura o sítio catalítico, a enzima fosforilada é estável. A enzima inibida pode ser espontaneamente reativada em diferentes velocidades dependendo do inibidor: para CB acontece muito rapidamente com um tempo de meia-vida de uma hora ou menos, enquanto que para OP contendo grupos alquil ramificados pode acontecer em uma velocidade muito baixa. Assim como carbamatos e organofosforados, outras classes de compostos orgânicos são capazes de inibir a AChE, porém, de forma reversível. Entre os quais estão alguns compostos da classe dos heterociclos que já são conhecidos por inibirem a enzima, como tacrina (aminoacridina) e donepezil (piperidina) (JEFFREY & CUMMINGS, 2000).

A classe dos heterociclos inclui uma miríade de compostos que se agrupam conforme semelhanças estruturais, como por exemplo, os pirazóis, os isoxazóis e as isoxazolinonas, que são heterociclos formados por um anel de cinco membros, que diferem estruturalmente quanto ao(s) respectivo(s) heteroátomo(s):

- Pirazóis possuem dois átomos de N ligados em posições adjacentes;
- Isoxazóis possuem como heteroátomos N e O ligados aos demais carbonos do ciclo;
- Isoxazolinonas possuem uma carbonila adjacente ao átomo de carbono do ciclo isoxazólico.

Essas classes de compostos possuem alguma atividade biológica (pirazóis possuem atividades antidiabéticas e antivirais (OUYANG et al, 2008); isoxazóis são usados como anti-lipidêmicos (HERRMANN et al, 1999); e isoxazolinonas são

usados como antibióticos (QUESNELLE et al, 2005)), porém poucos foram testados juntamente com a enzima AChE.

Com base em estudos prévios utilizando compostos pirazólicos aminossustituídos, os quais mostraram inibição da atividade da enzima AChE, e também devido ao potencial biológico dos compostos isoxazólicos e isoxazolinônicos, que apresentam pouca ou nenhuma referência a esta enzima, torna-se imprescindível a investigação do efeito de diferentes compostos dessas classes de heterociclos na atividade desta importante enzima.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo geral**

Verificar se os compostos pertencentes às três classes de heterociclos (pirazóis, isoxazóis e isoxazolinonas) exercem algum efeito sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Determinar o efeito de compostos das classes dos pirazóis, isoxazóis e isoxazolinonas sobre a atividade da enzima AChE cerebral de ratos nas seguintes estruturas cerebrais: córtex, estriado e hipocampo;
- Determinar os parâmetros cinéticos envolvidos nas interações entre os compostos e a enzima, caso forem registradas tais interações;
- Caracterizar o tipo de inibição entre os compostos e a enzima de acordo com modelos cinéticos já existentes;
- Comparar os resultados com os obtidos para a forma purificada da enzima AChE.

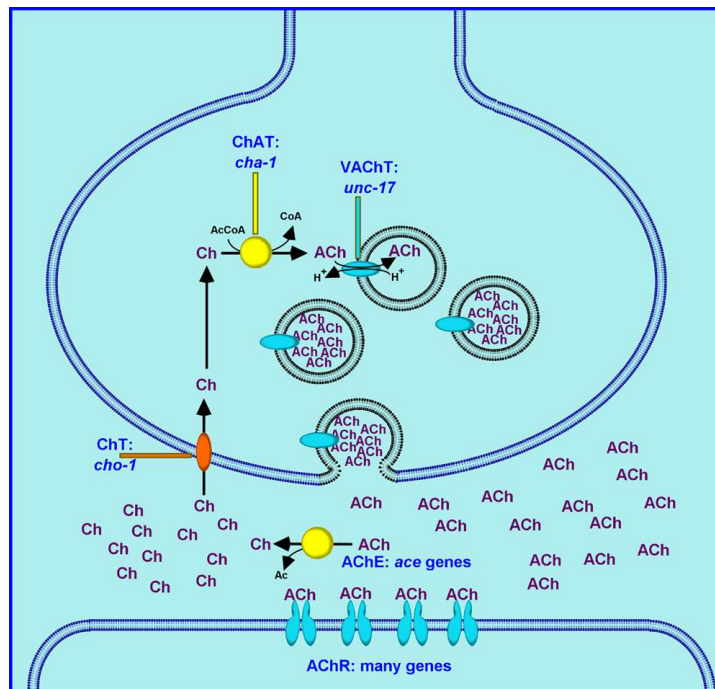
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Sistema colinérgico

O sistema colinérgico é uma das mais importantes vias de modulação do sistema nervoso central (SNC) desempenhando um papel fundamental em várias funções vitais, como aprendizado, memória, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral, o que faz deste sistema, alvo de inúmeras pesquisas (MESULAM et al., 2002). Neste contexto é relevante destacar os principais componentes que constituem o sistema colinérgico: a acetilcolina (ACh); a colina-acetiltransferase (ChAT); o transportador de colina (ChT); o transportador de acetilcolina vesicular (VACHT); os receptores de acetilcolina muscarínicos (mAChR) e os nicotínicos (nAChR) e a acetilcolinesterase (AChE), os quais juntos são responsáveis por modular a neurotransmissão colinérgica (KAWASHIMA & FUJII, 2003; SARTER & PARIKH, 2005).

A ACh foi a primeira substância identificada como um neurotransmissor (LOEWI, 1921). Foi identificada em *Ascaris* e outros nematóides em 1955 por Helen Mellanby (MELLANBY, 1955), e foi subsequentemente mostrada como um transmissor excitatório em junções neuromusculares de nematóides (DEL CASTILLO et al, 1963; DEL CASTILLO et al, 1967). Como mostrado na figura 1, a ACh é sintetizada pela ChAT na junção neuroefetora e ganglionar, a partir do acetil-CoA, um produto do metabolismo celular, e da colina, importante produto do metabolismo dos lipídeos da dieta (SOREQ & SEIDMAN, 2001; PRADO et al, 2002). Após, é carregada para as vesículas sinápticas por VACHT. O lúmen da vesícula sináptica é acidificado pela ação de uma bomba de próton dependente de ATP localizada da membrana da vesícula sináptica. O gradiente de pH entre o lúmen da vesícula e o citoplasma provém a força direcional para o transporte de ACh; VACHT essencialmente troca ACh por prótons. A limitação e preparação das vesículas sinápticas, e sua fusão com a membrana celular estimulada por cálcio são processos independentes do neurotransmissor contido nas vesículas. Após a fusão

da vesícula sináptica e liberação do neurotransmissor, a ACh se difunde na fenda sináptica e ativa os receptores de acetilcolina (AChRs), usualmente localizados nas células pós-sinápticas. A ação da ACh é finalizada pela hidrólise enzimática direta do neurotransmissor na fenda sináptica por AChE. A colina resultante é então transportada de volta para o neurônio pré-sináptico por um transportador de alta afinidade à colina (HACHT ou ChT); esta colina está então disponível para a síntese de ACh adicional (RAND, 2007).



**Figura 1:** Enzimas e transportadores colinérgicos. Adaptado de Rand, 2007.

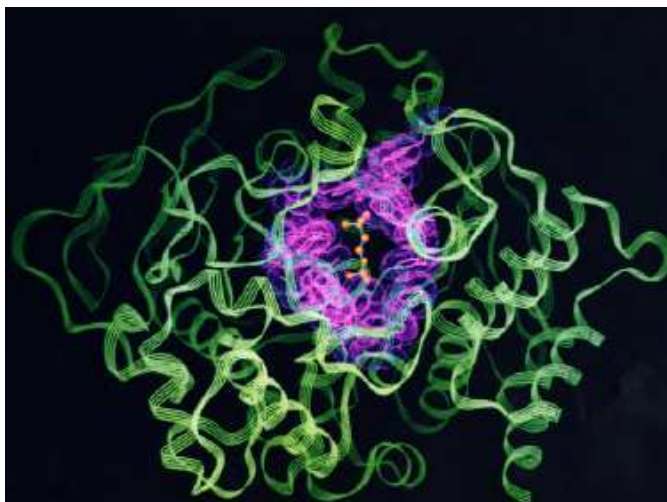
### 2.1.1 Acetilcolinesterase

A AChE (EC 3.1.1.7) é uma importante enzima regulatória que controla a transmissão do impulso nervoso através da sinapse colinérgica pela rápida hidrólise e inativação da ACh modulando a concentração deste neurotransmissor nas sinapses (GRISARU et al, 1999; SOREQ & SEIDMAN, 2001). É uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular.

A AChE pode ser classificada como uma serina hidrolase (SOREQ & SEIDMAN, 2001). Além de seu papel clássico na transmissão colinérgica a AChE tem sido implicada em várias ações não colinérgicas como crescimento dos neuritos (DAY & GREENFIEL, 2002), regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica, osteogênese (CHACÓN et al., 2003) e também tem sido proposto a atividade hematopoiética pela presença desta enzima em células progenitoras do sangue (SOREQ & SEIDMAN, 2001). A AChE também foi localizada e identificada em linfócitos onde provavelmente apresenta um papel importante na regulação das funções imunes (KAWASHIMA & FUJII, 2000).

### 2. 1. 2. Estrutura da AChE

A AChE é composta de um centro invariável de 534 aminoácidos e um peptídeo C-terminal de 14, 26 ou 40 aminoácidos (MESOHRER and SOREQ, 2006). A proteína purificada tem uma forma elipsoidal de 45x60x65 Å e, de acordo com sua estrutura, pertence à superfamília  $\alpha/\beta$ -hidrolase. O domínio catalítico da AChE é composto de uma tríade serina-histidina-glutamato, que basicamente, se assemelha ao sítio catalítico de outras serinas proteases, exceto que, nesse caso, o resíduo ácido é glutamato ao invés do aspartato usual. A cristalografia de raios-X revelou que a tríade catalítica está localizada no interior de um canal com 20 Å de comprimento, que penetra quase toda a proteína a partir de sua superfície (SUSSMAN et al, 1991). Este canal de acesso ao sítio ativo é circundado por 14 resíduos aromáticos localizados nas pontas entre diferentes folhas  $\beta$  (figura 2) (ZIMMERMAN & SOREQ, 2006).

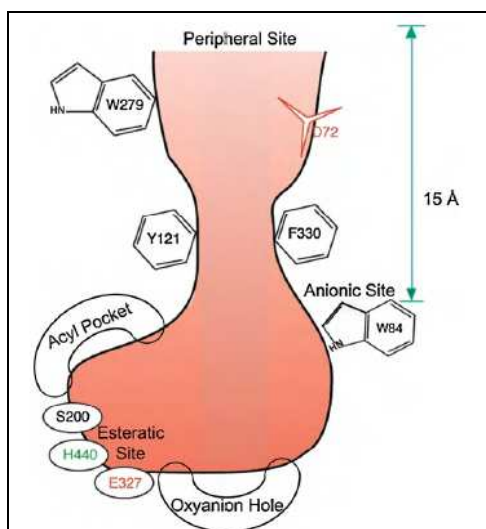


**Figura 2:** Estrutura 3D da TcAChE. Os 14 resíduos aromáticos conservados são mostrados em rosa. Um modelo do substrato, ACh, ligado no sítio ativo, é mostrado no fundo do canal sítio ativo, no formato bola-bastão. Adaptado de Dvir, 2010.

Muitos subsítios funcionais no canal sítio ativo foram identificados (figura 3) (SOREQ et al, 1990). Estes incluem (a) a tríade catalítica, Ser203, Glu334, e His447, que, transitoriamente, se ligam à porção acil do substrato; (b) a porção acil e (c) o subsítio hidrofóbico, que acomoda a porção álcool do estado de transição tetraédrico. Outro importante componente é (d) o “buraco oxianiônico” que estabiliza o estado de transição pela acomodação do oxigênio carbonílico carregado negativamente. Além da tríade catalítica invariável, todas as AChEs conhecidas incluem (e) um sítio de ligação secundário, referido como sítio aniônico periférico (PAS). Este sítio está envolvido na modificação da atividade catalítica (inibição pelo substrato) e na mediação de muitas interações com inibidores de AChE (GRISARU et al, 1999).

Em relação às áreas de ligações hidrofóbicas, um grande número de resíduos aromáticos se alinha ao canal e provêm sítios hidrofóbicos potenciais para a ligação de grupos alquil e aril de substratos e respectivos fragmentos catiônicos e inibidores (SUSSMAN et al, 1991; SUSSMAN et al, 1992) Na porção acil dos resíduos aromáticos de AChE, cria-se uma restrição quanto ao tamanho da porção acil do substrato (HAREL et al, 1992; VELLON et al, 1993; ORDENTLICH et al, 1993). Por outro lado, a estrutura tridimensional da AChE indicou que no canal sítio ativo há poucas cargas iônicas negativas. Dois resíduos aniônicos dentro do canal, Glu-327 e Asp-443, são essenciais para a maquinaria catalítica da enzima: Glu-327 é um

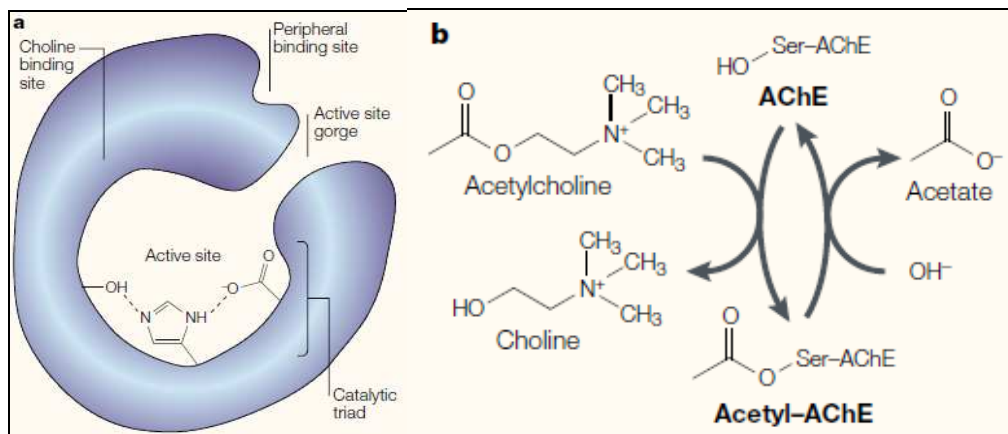
componente da tríade catalítica e Asp-443 parece estar ligado por pontes de hidrogênio à molécula de água-chave para manter uma posição adaptada para a reação química ser procedida (SOREQ et al, 1992).



**Figura 3:** Visão esquemática do canal de acesso ao sítio ativo da TcAChE. O fundo do canal é caracterizado por muitos subsítios: o sítio “aniônico”, pelo qual a porção colina do substrato interage; o sítio “esterásico”, que contém os três resíduos da tríade catalítica; o buraco “oxianiónico”, e a porção acil, que confere especificidade ao substrato. O sítio aniônico periférico (PAS) está localizado ~15Å acima do sítio ativo, próximo à entrada do canal. Adaptado de Dvir, 2010.

A única carga negativa na vizinhança do sítio esterásico, em uma distância adequada ao pólo catiónico do substrato fisiológico e, portanto, potencialmente capaz de funcionar como um sítio aniônico é Glu-199 (SUSSMAN et al, 1991; RIPOLL et al, 1993).

A natureza nucleofílica é transferida do anel imidazol da histidina para o grupo hidroxil da serina possibilitando a troca da porção colina do substrato, formando um intermediário acetil-enzima. Uma subsequente hidrólise libera o grupo acetato (figura 4).



**Figura 4:** Acetilcolinesterase. **a)** Características estruturais da enzima. Cristalografia de raios-X identificou um sítio ativo no fundo de um canal estreito, alinhado com cadeias laterais hidrofóbicas de aminoácidos. Um sítio de ligação periférico também foi identificado. **b)** A reação da acetilcolinesterase. AChE promove a hidrólise da acetilcolina pela formação de um intermediário acetil-AChE com a liberação de colina e a subsequente hidrólise do intermediário para liberar acetato. Adaptado de Soreq & Seidman, 2001.

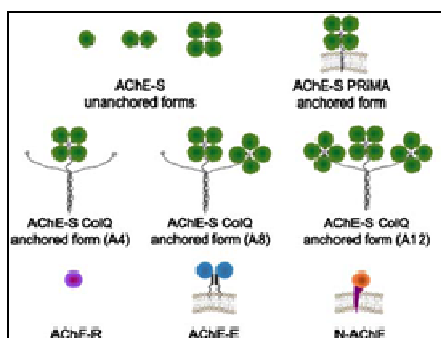
A AChE é encontrada em um conjunto variado de formas obtidas pelo uso promotor alternado de seu gene, splicing alternativo de transcritos de mRNA pré-AChE nascentes, multimerização de subunidades individuais de AChE e sua união com diferentes proteínas associadas ou ancoradas (ZIMMERMAN e SOREQ, 2006). O uso promotor alternado e o splicing alternativo, juntos, modificam as extremidades 5' e 3' do mRNA de AChE, permitindo a produção de seis unidades protéicas com diferentes porções N- e C-terminais. Existem três diferentes carboxi-terminais: a sináptica ou variável S, que é também chamada “cauda” (MASSOULIE, 2002), a eritrocítica ou variável E (LI et al, 1991), e a variável R (KAUFER et al, 1998). Estas unem as duas porções N-terminais para produzir variáveis com N-terminal comum ou alongada (MESOHRER et al, 2004). Já que o domínio catalítico de todas as isoformas de AChE permanece invariável, as características desses diferentes peptídeos terminais alteram muitos aspectos-chave dessa proteína. Uma característica proeminente de AChE-S, a forma mais abundante no sistema nervoso central, é um resíduo cisteína C-terminal localizado a três aminoácidos do fim da proteína. Este resíduo cisteína permite a ligação dissulfeto com outras unidades AChE-S dando origem a homodímeros e homotetrâmeros anfipáticos (ZIMMERMAN e SOREQ, 2006). Além de sua sequência diferente de aminoácidos, a porção AChE-R difere da AChE-S em duas características óbvias: (1) é hidrofílica e (2) pela falta do resíduo cisteína C-terminal encontrado em AChE-S, não pode tetramerizar por



ligação dissulfeto com outras subunidades. Isto produz uma molécula monomérica solúvel ao invés de tetrâmeros anfipáticos compostos de dímeros.

Tetrâmeros AChE-S se associam com uma das duas moléculas âncoras de membrana, que determinam parcialmente a localização sináptica da proteína: colágeno Q (ColQ), nas junções neuromusculares, e uma âncora de membrana rica em prolina (PRiMA) nas sinapses cerebrais (MASSOULIE et al, 1999). Unidades ColQ homotrimerizam-se pela formação de uma estrutura helicoidal tripla em um domínio rico em prolina na sua porção C-terminal (BON e GREENFIELD, 2003; BON et al, 2003). Já que cada ColQ pode atacar um tetrâmero de AChE, complexos hetero-oligoméricos podem conter 4, 8 ou 12 subunidades de AChE, designadas A4, A8 e A12, respectivamente. A glicoproteína PRiMA, por sua vez, induz a formação de homotetrâmeros de AChE e, se liga a eles, por uma porção rica em prolina mantendo-os ancorados à membrana celular por um domínio transmembrana (PERRIER et al, 2002).

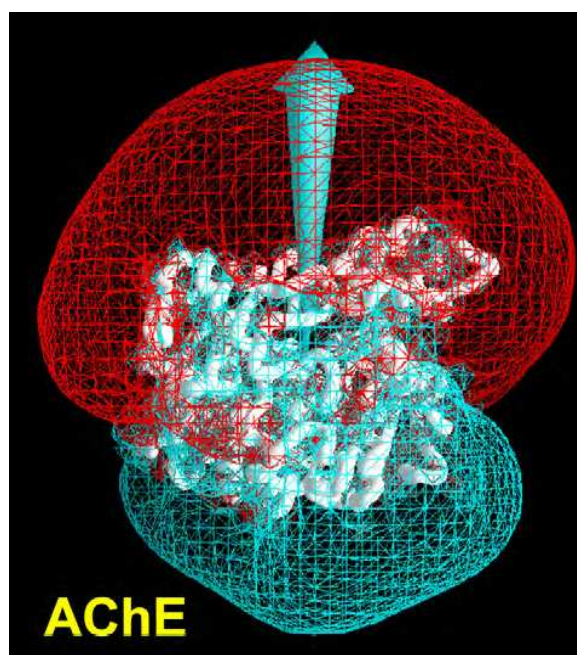
Tetrâmeros de AChE associados com PRiMA são tradicionalmente designados como G4, para globular, e monômeros e homodímeros não-associados a qualquer proteína âncora são designados G1 e G2, respectivamente (Figura 5). AChE-R necessita de um domínio hidrofílico e é incapaz de se ligar a ColQ ou PRiMA. Dessa forma, permanece solúvel e sua forma secretada mostra maior mobilidade do que AChE-S (SOREQ & SEIDMAN, 2001).



**Figura 5:** Produtos proteicos alternativos do gene de AChE. Unidades AChE-S podem dimerizar, tetramerizar ou permanecerem como monômeros. Tetrâmeros AChE-S podem permanecer solúveis ou se tornarem ancorados à membrana pelas moléculas ColQ ou PRiMA. AChE-R permanece inerentemente como um monômero solúvel. Formas dimerizadas de AChE-E ligadas à membrana de células sanguíneas. Adaptado de Zimmerman & Soreq, 2006.

### 2. 1. 3. Mecanismo de hidrólise da AChE

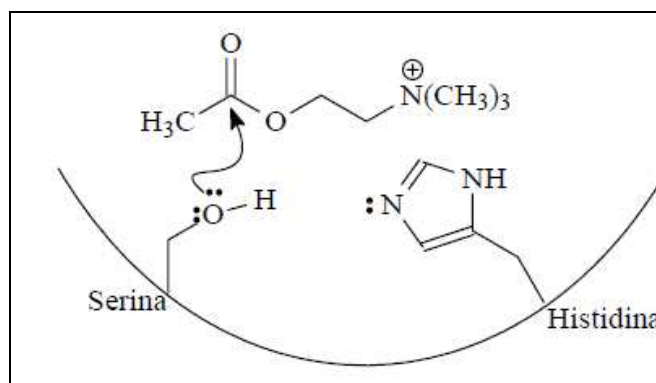
A elucidação da estrutura cristalina da AChE revelou uma notável distribuição bipolar de cargas na superfície da enzima, com o pólo aniônico envolvendo a entrada do canal, e o pólo catiônico estando no seu interior (figura 6) (SUSSMAN et al, 1991). Essa característica foi inicialmente proposta para explicar a atração do substrato carregado positivamente até a entrada do canal; entretanto, neutralização por mutagênese de sete resíduos carregados ao redor do canal não alteraram a velocidade hidrolítica de AChE (SHAFFERMAN et al 1994).



**Figura 6:** Modelo estrutural da TcAChE com potencial eletrostático sobreposto. Esqueleto protéico está representado como emaranhado branco. A superfície vermelha corresponde ao contorno isotopotencial,  $-1kT/e$ , e a azul ao contorno isotopotencial  $+1kT/e$ , onde  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura, e  $e$  é a carga eletrônica. Seta indica a direção do dipolo na proteína. Adaptado de Dvir, 2010.

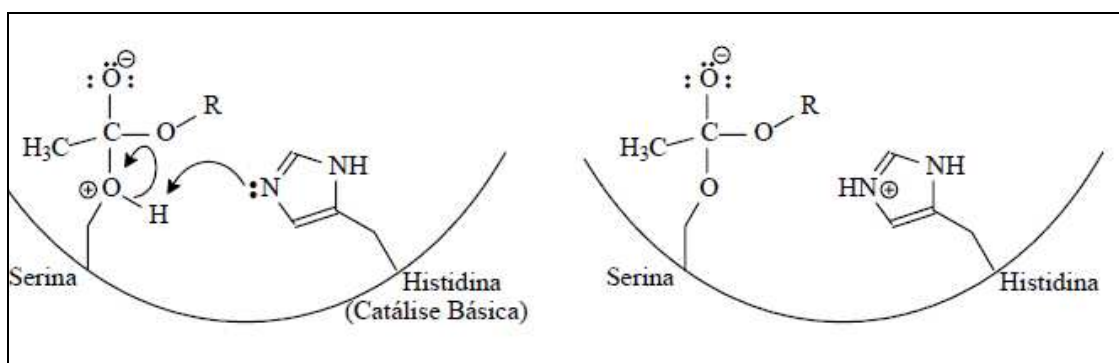
Na entrada do canal, o substrato se liga transitoriamente ao PAS (SZEGLITES et al, 1999), presumivelmente induzindo trocas estruturais (KITZ et al, 1970) que podem facilitar a passagem de ACh pelo canal. Uma vez dentro do canal, os grupos aromáticos localizados ao redor da sua extremidade guiam o substrato da superfície da proteína até o sítio ativo, onde o subsítio aniônico se liga à colina e

posiciona o éster no sítio de acilação. A serina age então, como um nucleófilo atacando o carbono eletrofílico da carbonila do éster. Essa adição nucleofílica abre o grupo carbonila (OBREGON, 2006, figura 7)



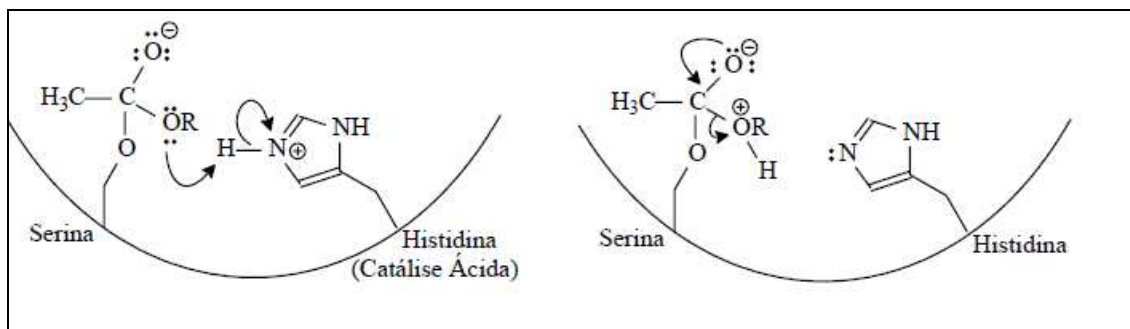
**Figura 7.** Mecanismo de hidrólise da AChE – ataque nucleofílico.

Para estabilizar a carga positiva do oxigênio da serina, a histidina age como uma base, capturando o próton desse oxigênio, com isso se estabelece a ligação do éster à serina (figura 8).



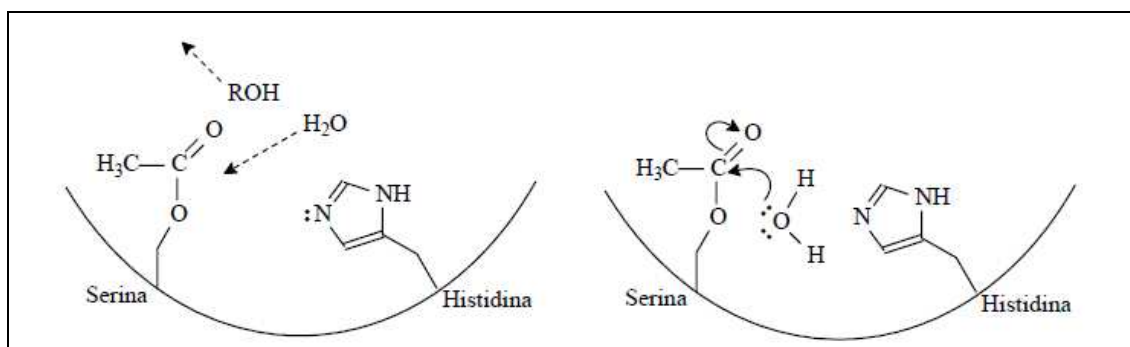
**Figura 8.** Mecanismo de hidrólise da AChE – catálise básica.

Logo em seguida, a histidina exerce uma catálise ácida, protonando a função éster do intermediário, tornando-se um bom grupo abandonador (figura 9).



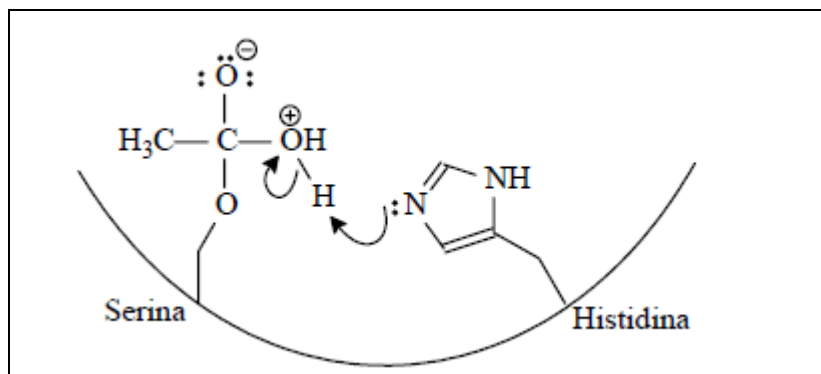
**Figura 9.** Mecanismo de hidrólise da AChE – catálise ácida.

O grupo carbonila é recuperado e a porção álcool do éster (colina) é liberada. Nesse estágio da reação, uma molécula de água age como nucleófilo, atacando o carbono eletrofílico do grupamento acetila (figura 10). A colina liberada já pode ser recapturada e usada na síntese de outras moléculas de ACh.



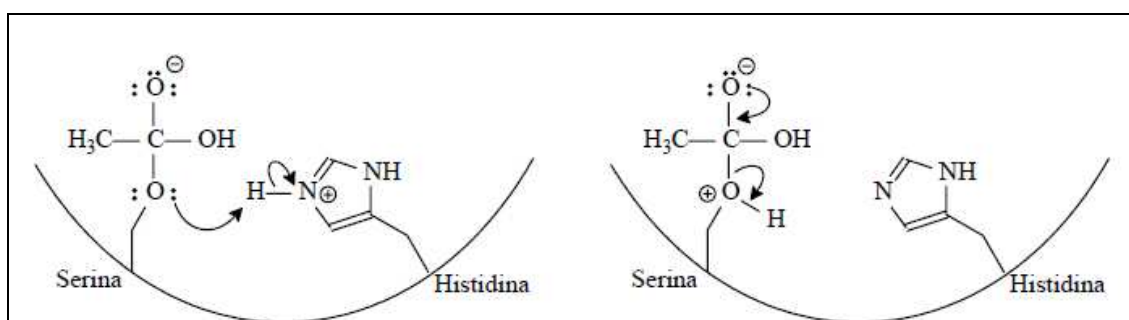
**Figura 10.** Mecanismo de hidrólise da AChE – ataque nucleofílico da água.

Posteriormente, a histidina, por catálise básica, desprotona a água, aumentando o seu poder nucleofílico. Com isso estabiliza a ligação do oxigênio ao carbono do grupo acetila, recuperando o grupo acetila (figura 11).



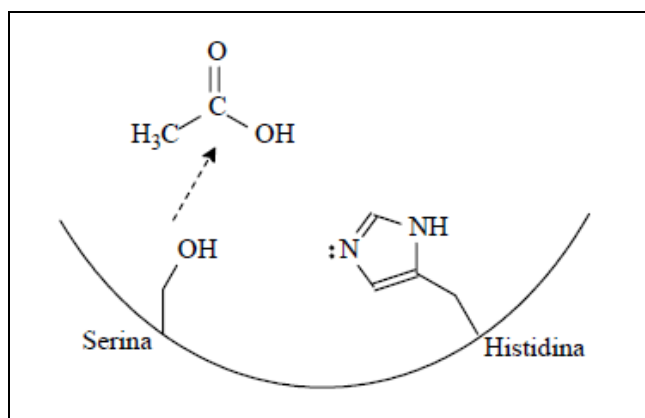
**Figura 11.** Mecanismo de hidrólise da AChE – catálise básica.

A histidina então, novamente, exerce uma catálise ácida protonando o intermediário (oxigênio da serina) recuperando, em seguida, o grupo hidroxila do resíduo de serina (figura 12).



**Figura 12.** Mecanismo de hidrólise da AChE – catálise ácida.

Após a protonação do oxigênio da serina, a carbonila é recuperada e o grupo acetila torna-se um bom grupo abandonador. Com isso, o acetato deixa o sítio ativo e libera a enzima para o novo ciclo catalítico (figura 13).



**Figura 13.** Mecanismo de hidrólise da AChE – restauração do sítio-ativo.

O mecanismo pelo qual as moléculas de acetil e colina produzidas nesta reação são expelidas do canal ainda não é compreendido. Rotas de liberação alternativas, às vezes chamadas de “back door”, têm sido postuladas (GILSON et al, 1994), mas provas experimentais claras para esta hipótese ainda são necessárias. Surpreendentemente, a liberação de uma vesícula de ACh do terminal pré-sináptico basta para saturar todos os receptores colinérgicos e colinesterases num diâmetro de 0,5  $\mu\text{m}$  do sítio de liberação (BARTOL et al, 1991). Já que a ligação da ACh no seu receptor é muito mais rápida do que a velocidade com que ela é hidrolisada pela AChE, a quantidade de moléculas de ACh que inicialmente se ligarão aos receptores sinápticos é determinada pela razão entre receptores e esterase: aproximadamente 20% de esterase e 80% de receptores (ANGLISTER et al, 1994). A velocidade que a ACh é liberada dos receptores ativados é menor do que sua velocidade de hidrólise, de modo que, quando moléculas de ACh são liberadas, mais unidades de AChE estão livres e capazes de se ligar a uma nova molécula de ACh, mantendo, deste modo, uma baixa concentração de ACh na fenda e virtualmente excluindo a possibilidade de uma molécula de ACh ativar outro receptor.

Este dinamismo explica por que a inibição da AChE tem um efeito mais agudo na duração do potencial excitatório pós-sináptico do que na sua amplitude (COLLIER & KATZ, 1991).

A velocidade enzimática de AChE é diminuída em concentração excessiva de substrato. A ligação de uma segunda molécula de ACh ao PAS, aparentemente, diminui a desacetilação ou a formação do complexo induzido durante a hidrólise (KRUPKA, 1963; ROSENBERRY, 1975). Mutações em Asp-74 e Trp-286, que

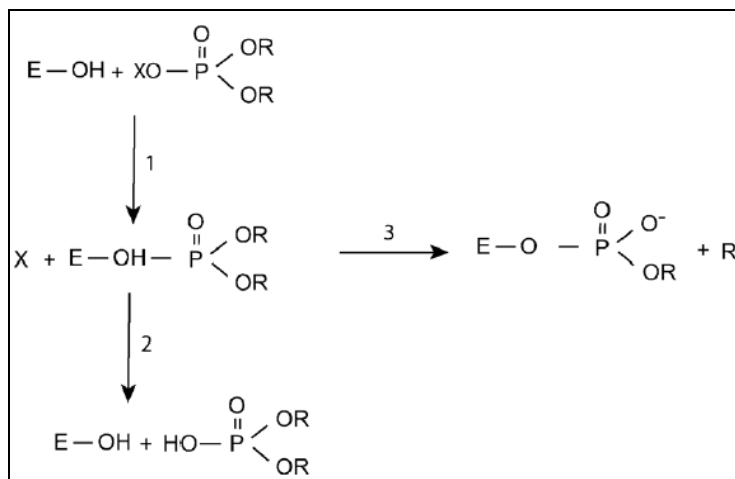
diminuem a afinidade pelo PAS, dramaticamente reduziram a inibição pelo substrato (SHAFFERMAN et al, 1992) corroborando a importância do PAS em tais processos. Condições ambientais também mostraram contribuir para mudanças que influenciam a inibição pelo substrato. Por exemplo, AChE extraída de mosquito não mostra inibição pelo substrato, mas quando tratada com tiocianato, que converte a enzima a seus derivados não anfifílicos, há inibição pelo substrato (DARY & WEDDING, 1990).

## **2. 2. Histórico dos inibidores da AChE**

### **2. 2. 1. Organofosforados e carbamatos**

Compostos organofosforados (OP) tais como soman, sarin, tabun, VX e outros, têm sido usados como pesticidas e desenvolvidos como armas químicas (EDDLESTON et al, 2008). Carbamatos (CB) são usados como pesticidas e alguns deles, como fisostigmina, pirostigmina, ganstigmina, têm sido registrados como drogas humanas (JOKANOVIC, 2009). Os CB também agem pela carbamilação do mesmo sítio da AChE, que reversivelmente inibe a atividade da enzima. A inibição da AChE resulta do acúmulo de ACh nos sítios dos receptores colinérgicos, produzindo estimulação contínua das fibras colinérgicas através do sistema nervoso central e periférico (JOKANOVIC, 2009).

O alvo primário de OPs é a AChE. Esses compostos possuem uma porção  $P=O$  que fosforila o grupo hidroxil da serina no sítio ativo da enzima, impedindo, assim, sua ação no substrato fisiológico (Figura 14) (COSTA, 2006).



**Figura 14:** Representação esquemática da interação bioquímica entre OPs e AChE. Reação 1 conduz a AChE fosforilada. Reação 2 é a espontânea reativação da AChE. Reação 3 é a estabilização e conduz a AChE fosforilada, carregada negativamente e estável. E-OH = sítio ativo da enzima. Adaptado de Costa, 2006.

A ligação entre o átomo de fósforo e o sítio esterásico da enzima é mais estável do que a ligação entre o carbono carbonílico do acetato (na acetilcolina) no mesmo sítio-ativo da enzima. Enquanto a quebra da ligação carbono-enzima é completada em poucos microssegundos, a quebra da ligação fósforo-enzima leva de poucas horas a muitos dias, dependendo da estrutura química do OP (GALLO & LAWRYK, 1991). A AChE fosforilada é hidrolisada por água em baixa velocidade, dependendo da natureza do substituinte R (por exemplo, reativação diminui na ordem: dimetóxi>dietóxi>>diisopropóxi). A reativação da AChE fosforilada não ocorre uma vez que o complexo inibidor tenha se estabilizado (figura 14). A estabilização consiste na perda (pela hidrólise não-enzimática) de um dos dois grupos R, e a velocidade de estabilização depende da natureza do grupo alcóxi (por exemplo, AChE fosforilada por um fosfato isopropóxi estabiliza muito rapidamente). Quando a AChE fosforilada é estabilizada, a enzima pode ser considerada inibida irreversivelmente e a única forma de recuperar sua atividade é através da síntese de uma nova enzima, um processo que leva dias (COSTA, 2006).

A ACh liberada de terminais nervosos colinérgicos é concebida unicamente para a hidrólise pela AChE. De fato, diferente de outros neurotransmissores, como a noradrenalina, é o produto da hidrólise de ACh por AChE, colina, que é levado ao terminal pré-sináptico. Dessa forma, a inibição de AChE por OPs causa acúmulo de ACh nas sinapses colinérgicas, com uma super-estimulação de receptores



nicotínicos e muscarínicos. Esta “síndrome colinérgica” inclui aumento de transpiração e salivação, profunda secreção brônquica, broncoconstrição, miosis, diarreia, tremores, espasmos musculares e vários efeitos no SNC (LOTTI, 2000; 2001).

A recente descoberta da inibição de AChE por OPs conduziu ao seu desenvolvimento, primeiramente como inseticidas, mas também como armas químicas (COSTA, 2006). Poucos OPs foram desenvolvidos como drogas farmacêuticas. Exemplos são o metrifonato e o ecotiofato. Entretanto o uso desses inibidores de AChE para o tratamento de certas patologias (miastenia grave, AD) evoca principalmente o uso de carbamatos ou outros compostos (TAYLOR, 1996).

Os compostos derivados do ácido carbâmico são provavelmente os inseticidas com mais ampla atividade biocida. Eles interagem com a hidroxila do aminoácido serina presente no sítio ativo da AChE levando à carbamilação desse grupo de forma reversível, sendo que a descarbamilação desse resíduo de aminoácido leva de 30 a 40 minutos para ocorrer (KUHR & DOROUGH, 1976).

Como os carbamatos são inibidores reversíveis da AChE e apresentam um alto grau de afinidade na ligação com a enzima, várias moléculas com o grupo carbamato foram sintetizadas nos últimos anos (OGANE et al, 1992; MARTIN et al, 1997; MUSTAZZA et al, 2002). A rivastigmina é o protótipo mais promissor dessa classe, produzido pelo laboratório farmacêutico Novartis e amplamente utilizado no tratamento da AD (POLINSKI, 1998).

## 2. 2. 2. Inibidores de uso terapêutico

Os Inibidores da AChE (AChEIs) têm uma longa história, mas a aplicação clínica desses AChEIs no campo da DA começou apenas no início dos anos de 1980 com a administração oral e intravenosa de fisostigmina (DAVIS & MOHS, 1982; THAL et al, 1983). Os resultados desses primeiros tratamentos experimentais foram encorajadores, pois eles demonstraram potencial na redução do dano no processo cognitivo. Entretanto, o efeito da fisostigmina foi de curta duração e seus efeitos colaterais colinérgicos muito frequentes e pronunciados (GIACOBINI, 1998).

AChEIs foram recentemente introduzidos como agentes melhoradores da cognição em pacientes que sofrem de DA leve ou moderada (JEFFREY & CUMMINGS, 2000). A tacrina (Cognex®) (DAVIS et al., 1992; FARLOW et al., 1992; KNAPP et al., 1994), o donepezil (Aricept® 1996) (ROGERS et al., 1998), a rivastigmina (Exelon® 2000) (COREY-BLOOM et al., 1998; SRAMEK et al., 1996) e a galantamina (Reminyl® 2001) (RAINER, 1997) foram aprovados pelo U.S Food and Drug Administration (FDA); outros vários compostos também têm sido investigados com potencial terapêutico benéfico na DA (JEFFREY & CUMMINGS, 2000).

Estes agentes exercem seus efeitos benéficos na função intelectual pelo bloqueio da AChE e melhoramento da função colinérgica. Eles foram desenvolvidos para melhorar os déficits neurofisiológicos da DA, como mostrado na maioria dos testes clínicos com esses compostos (JEFFREY & CUMMINGS, 2000).

### 2. 2. 3. Classes de inibidores terapêuticos da AChE

A tabela I mostra informações comparativas dos principais AChEIs atualmente disponíveis. Essas drogas representam diferentes agentes: a fisostigmina é um carbamato, a tacrina e a velnacrina são acridinas, o donepezil é uma piperidina, a rivastigmina e a eptastigmina são carbamatos, o metrifonato é um organofosfato e a galantamina é um alcalóide fenantreno (JEFFREY & CUMMINGS, 1997). Eles diferem principalmente no tipo de ligação que formam com a AChE. A tacrina, a velnacrina, o donepezil e a huperzina são inibidores não covalentes de alta afinidade; o metrifonato forma uma ligação covalente irreversível com o substrato; a tacrina e a velnacrina são inibidores não-competitivos; o donepezil tem propriedades não-competitivas e competitivas; a galantamina é um inibidor competitivo e o metrifonato inicia com uma inibição não-competitiva e se torna inibidor competitivo com o tempo (TAYLOR, 1998).

Em geral, esses compostos podem ser divididos em três classes principais, com base na sua estrutura e mecanismo (BENZI et al, 1998): (i) *compostos amino-terciários* (inibidores reversíveis ou não-competitivos, como o donepezil, ou de tipo misto, como a tacrina, que causa inibição alostérica da AChE pela ligação a uma

região hidrofóbica, próxima aos sítios aniônicos  $\alpha$  ou  $\beta$  na sua superfície), (ii) *carbamatos* (como ENA 713 e a eptastigmina, inibidores pseudo-irreversíveis, que formam um complexo carbamilado com o resíduo serina da tríade catalítica da enzima que é hidrolisada em uma velocidade menor do que a forma acilada) e (iii) *organofosfatos* (inibidores irreversíveis, como o diclorvos, um metabólito ativo do metrifonato, que forma uma ligação covalente com o resíduo serina, originando, portanto, um composto enzima-inibidor estável). Além disso, alguns inibidores são descritos como seletivos para a AChE como o donepezil, o ENA 713, a galantamina, ao passo que a tacrina é o mais potente inibidor da BuChE (FREEMAN & DAWSON, 1991).

**Tabela 1: Características farmacológicas de alguns AChEIs**

Nome	Classe	Seletividade	Reversibilidade	Ação no sítio ativo	Tipo de inibição	Biodisponibilidade (%)
Tacrina	Acridina <sup>a</sup>	BuChE>AChE	Reversível	Aniônico	Não competitiva	17-33
Donepezil	Piperidina	BuChE>AChE	Reversível	Aniônico	Mista	100
Rivastigmina	Carbamato	AChE>BuChE	Pseudo-irreversível	Esterásico	b	40
Fisostigmina	Carbamato	BuChE>AChE	Reversível	Esterásico	b	3-8
Metrifonato	Organofosfato	BuChE>AChE	Irreversível	Esterásico	Alternada	b
Galantamina	Fenantreno	AChE>BuChE	Reversível	b	Competitiva	85
Eptastigmina	Carbamato	BuChE>AChE	reversível	b	b	b

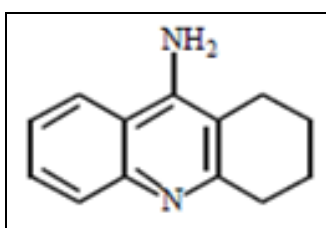
a: Acetilcolinesterase

b: informação não disponível pelo autor

### *Tacrina*

O composto tetrahydroaminoacridina, genericamente conhecido como tacrina (Tacrinal® ou Cognex®), foi o primeiro inibidor da AChE a ser aprovado pelo FDA para o tratamento da DA em 1993 (DAVIS & POWCHICK, 1995). Este composto possui várias ações no organismo tais como inibição da monoamino oxidase, bloqueio dos canais de potássio, e interações com subtipos de receptores muscarínicos e nicotínicos (McGLEENON et al, 1999). Entretanto a ação mais

proeminente é como inibidor reversível de colinesterase. A tacrina é rapidamente absorvida e processada pelo fígado durante o primeiro passo do metabolismo (SELEN et al, 1988; McNALLY et al, 1989). Esse composto parece melhorar a função cognitiva e déficits comportamentais em pacientes com DA em doses que variam de 80 a 160 mg/dia, com uma significativa relação dose-resposta (RACCHI et al, 2004). Entretanto, a molécula mostra vários efeitos colaterais entre eles, o aumento nos níveis de transaminase e hepatotoxicidade.

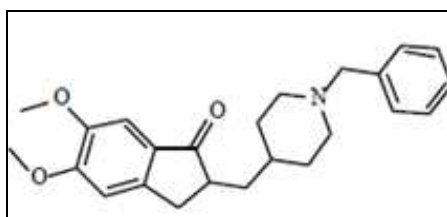


**Figura 15:** Tacrina

### *Donepezil*

O hidrocloreto de donepezila foi a segunda droga aprovada pelo FDA para o tratamento de DA leve ou moderada. É uma nova classe de AChEI, possuindo uma porção N-benzilpiperidina e uma indanona, que mostra ação mais longa e seletiva. É vendido nos EUA e em países da Europa e Ásia com o nome de Aricept® (SUGIMOTO et al, 2002).

O donepezil é um inibidor reversível da AChE, com seletividade para esta enzima melhor do que a tacrina (SUGIMOTO et al, 1992) e sua seletividade no SNC é alcançada pela falta de atividade em tecidos periféricos tais como tecido cardíaco ou intestino delgado (ROGERS et al, 1991). Exames clínicos para a avaliação da droga em DA mostraram efeitos benéficos na cognição em tratamentos a longo e a curto prazos, diminuindo, dessa forma, a progressão sintomática da doença. A droga é geralmente bem tolerada, com efeitos colaterais colinérgicos típicos, como náusea, vômitos, diarreia, constipação, alguns casos de dor de cabeça, tonturas, e distúrbios do sono, todos de natureza branda (RACCHI et al, 2004).

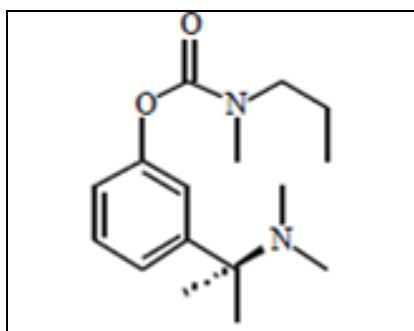


**Figura 16:** Donepezil

### *Rivastigmina*

A rivastigmina é um carbamato, com inibição pseudo-irreversível da AChE que, em estudos bioquímicos pré-clínicos, mostrou significativa seletividade ao SNC (ENZ et al, 1993). Esse composto foi selecionado para exames clínicos devido a sua maior afinidade pela AChE G1 cerebral do que pelas formas periféricas da enzima, sua estabilidade química, sua ação de longa duração *in vivo* e sua boa tolerância (ENZ et al, 1991). Foi aprovado pela Agência Europeia de avaliação de Produtos Medicinais, em 1998, e pelo FDA em 2000, com o nome de Exelon® para o tratamento de DA (BAR-ON et al, 2002).

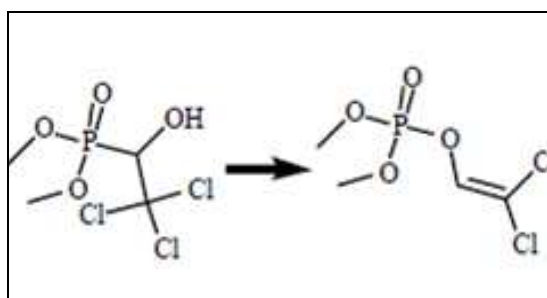
A rivastigmina, assim como o donepezil, possui nítida seletividade pelo SNC (ANAND et al, 1996; ANAND & GHARABAWI, 1996), com estudos animais mostrando efeito específico no córtex e hipocampo (ENZ et al, 1993). A rivastigmina não se liga a proteínas do plasma, e é inativada pela clivagem durante a inibição enzimática. Isto evita o metabolismo hepático e a droga é rapidamente excretada pelos rins (McGLEENON et al, 1999).



**Figura 17:** Rivastigmina

### *Metrifonato*

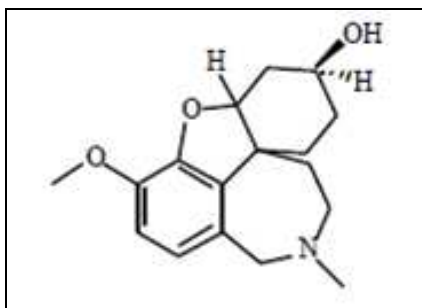
O metrifonato é um produto que, em solução aquosa se rearranja no organosfosfato ativo diclorvos (2-2-diclorovinil-dimetil-fosfato) ou DDVP (HINZ et al, 1996). Esse último composto é um inibidor irreversível da AChE que, em estudos pré-clínicos, mostrou melhora da performance cognitiva em ratos com uma tolerância favorável (RACCHI et al, 2004). O metrifonato, quando administrado oralmente em pacientes com DA, em uma única dose diária, rapidamente entrou no cérebro e inibiu a atividade da AChE de forma dose-dependente. A droga também foi benéfica nas funções globais desses pacientes, incluindo cognição, atividades diárias, e comportamento. A droga foi bem tolerada em todos os estudos clínicos, sem nenhuma anormalidade clinicamente significativa e com efeitos adversos previsíveis, como náusea, cólicas e diarreia (CUMMINGS 1998; JANN, 1998; TARIOT, 1998).



**Figura 18:** Metrifonato

### *Galantamina*

A galantamina é a última droga aprovada para o tratamento da DA (Reminyl®). É um alcalóide terciário com um modo de ação singular (RACCHI et al, 2004). É um inibidor de AChE reversível e competitivo, e também um modulador alostérico dos receptores nicotínicos de ACh (nAChRs) (SCHRATTENHOLZ et al, 1996; COYLE et al, 2001). O impacto clínico desse último mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido. A galantamina exibe favoráveis características farmacocinéticas, incluindo eliminação cinética linear nas doses de manutenção recomendadas (16 e 24 mg/dia), um tempo de meia-vida curto (aproximadamente 7 h), e alta biodisponibilidade, e os efeitos colaterais incluem previsíveis distúrbios gastrointestinais, que são passageiros (TARIOT, 2001; LILIENFELD, 2002).

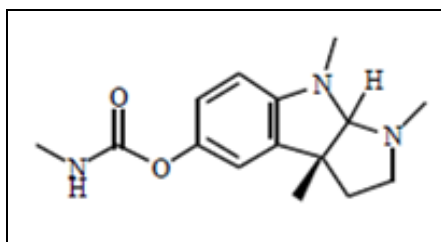


**Figura 19:** Galantamina

### *Fisostigmina*

A fisostigmina foi o AChEI mais estudado no início do desenvolvimento de drogas para DA (JEFFREY & CUMMINGS, 1997). É um carbamato que age inibindo a AChE através da estimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos (BRENNER, 2000). Por ser uma amina terciária, pode atravessar a barreira hematoencefálica e ser usada para o tratamento de sobredoses de medicamentos como a atropina, a escopolamina e outras drogas anticolinérgicas. Diversos estudos clínicos

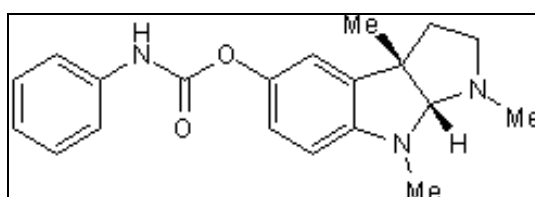
foram feitos e foi evidenciado melhoramento cognitivo (HARRELL et al, 1990), grande recuperação comportamental durando até três dias após a administração intramuscular da droga (SCHWARTZ et al, 1986), diminuição de alucinações (MOLCHAN et al, 1991), entre outros. Os efeitos colaterais incluem a depressão e uma overdose pode acarretar uma síndrome colinérgica (BRENNER, 2000).



**Figura 20:** Fisostigmina

### *Fenserina*

A fenserina é um fenil carbamato derivado da fisostigmina e um inibidor de AChE pseudo-irreversível (GREIG et al, 1995; IJIMA et al, 1993). É um novo inibidor de AChE potente e altamente seletivo, com uma atividade 50 vezes maior para a AChE do que para outras colinesterases (RACCHI et al, 2004). O composto foi testado clinicamente para o tratamento da DA, embora nenhum dado clínico tenha sido relatado. Em exames pré-clínicos, a fenserina mostrou menor toxicidade e melhoramento robusto das funções cognitivas quando comparado com a tacrina e com a fisostigmina (RACCHI et al, 2004). A fenserina tem um alto e longo período de inibição de AChE, com um tempo de duração excedendo 8h e com uma biodisponibilidade oral de 100% (GREIG et al, 2000).



**Figura 21:** Fenserina



## Ganstigmina

A ganstigmina é um novo inibidor da AChE desenvolvido para o tratamento da DA. É um inibidor seletivo para AChE, sendo 115 vezes mais potente contra essa enzima do que contra outras colinesterases e também mais seletivo para AChE central (cérebro) do que a AChE periférica (coração) (PIETRA et al, 1999). Mostra significantes efeitos neuroquímicos em ratos, incluindo atenuação da amnésia induzida por escopolamina (TRABACE et al, 2002). Dor de cabeça leve e náusea podem ser os sintomas adversos mais comuns, além de vômitos e anorexia, que ocorrem em doses mais altas (RACCHI et al, 2004)

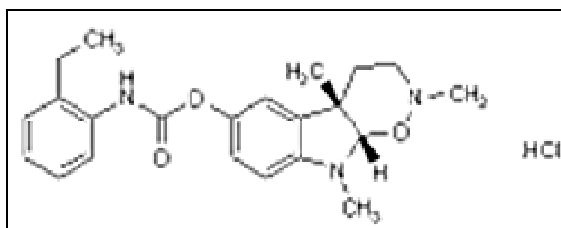


Figura 22: Ganstigmina

## Huperzina

A huperzina A (HupA) é um alcalóide isolado da erva chinesa *Huperzia serrata*. Quimicamente é um sesquiterpeno insaturado com uma porção piridona e um grupo amino primário. Sua fórmula empírica é  $C_{15}H_{18}N_2O$ , e seu peso molecular 242 g/mol. O composto é opticamente ativo e na planta está presente apenas o enantiômero (-). É uma molécula muito estável, com uma aparência branca cristalina, solúvel em ácidos aquosos e  $CHCl_3$  (GEIB et al, 1991).

É um potente inibidor reversível da AChE que atua em concentrações nanomolares com um mecanismo estereosseletivo: (-) HupA, a forma naturalmente recorrente, é o enantiômero mais potente (HANIN et al, 1993).

HupA se liga aos resíduos aromáticos no canal sítio ativo da AChE, localizado entre Trp86 e Tyr337 na enzima (VED et al, 1997). A formação do complexo HupA-enzima é rápida e a dissociação é lenta (ASHANI et al, 1992). HupA parece se ligar mais fortemente e especificamente ao fundo do canal sítio ativo da AChE (que guia as moléculas de ACh até ao centro de clivagem) do que outros inibidores de AChE, tais como tacrina (ZANGARA et al, 2003). Os locais de ligação da HupA ao sítio ativo são o grupo amônio que forma ligações de hidrogênio com Asp72, Trp84 e Asn85, e o grupo NH que também forma ligações de hidrogênio com Tyr130 e Glu199. A análise estrutural, surpreendentemente revelou que HupA não possui nenhuma semelhança com ACh e que o complexo HupA-AChE se liga ao canal sítio ativo da enzima com poucos contatos diretos com a proteína. Apenas uma ligação forte com o hidrogênio é vista, bem como algumas interações hidrofóbicas com o complexo cristalino (RAVES et al, 1997). A imagem computacional em 3-D do complexo HupA-AChE, gerada pelo estudo de Raves, revelou como a HupA bloqueia a enzima pelo suave deslizamento no sítio ativo da AChE, onde ACh é quebrada, e tranca este sítio através de várias ligações químicas. Foi demonstrado também que HupA pode formar uma ligação de hidrogênio extra com Trp337 no sítio da colina que existe apenas em AChE de mamíferos (SAXENA et al, 1994, SUSSMAN et al, 1991).

Estudos mostraram que a HupA tem um apropriado perfil farmacológico e de melhoramento cognitivo para a DA e danos de memória relacionados a idade. Também possui um poderoso e duradouro efeito no cérebro enquanto mantém baixos efeitos colaterais, ao contrário de outros inibidores de AChE (ZANGARA et al, 2003).

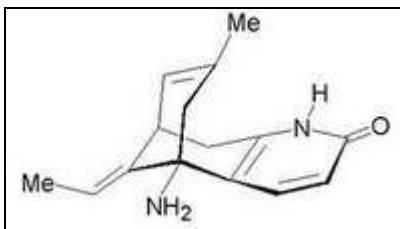


Figura 23: Estrutura química da Huperzina

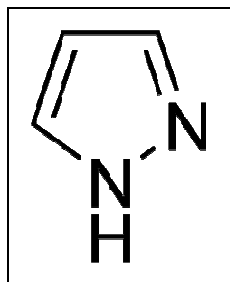
## 2. 3. Compostos heterocíclicos — pirazóis, isoxazóis e isoxazolinonas

### 2. 3. 1. Pirazóis

Pirazol se refere a uma classe de compostos orgânicos de anel aromático simples da série dos heterociclos caracterizado por um anel de 5 membros composto por três átomos de carbono e dois de nitrogênio em posições adjacentes.

O núcleo pirazol é térmica e hidroliticamente muito estável. Quando desprotonado, o pirazol se torna o íon pirazolida, que pode coordenar-se a outras espécies através de ambos os átomos de nitrogênio (TROFIMENKO, 1972). A nucleofilicidade dos nitrogênios e sua acessibilidade estérica podem variar através da substituição apropriada do anel (GRANDBERG et al, 1961). Por essas características, a química de pirazóis tem sido vigorosamente estudada, com maior atenção as suas características biológicas.

Os pirazóis e seus derivados exibem um amplo espectro de atividades biológicas tais como atividades antimicrobiana (BOYNE et al, 2006), herbicida (VICENTINI et al. 2005), anti-tumoral (PEVARELO et. al. 2004) e anti-inflamatória (FANCELLI et al.2006). Com a crescente aplicação de sua síntese e bioatividade, químicos e biólogos têm direcionado considerável atenção na pesquisa de derivados pirazólicos nos últimos anos (OUYANG et al, 2008).



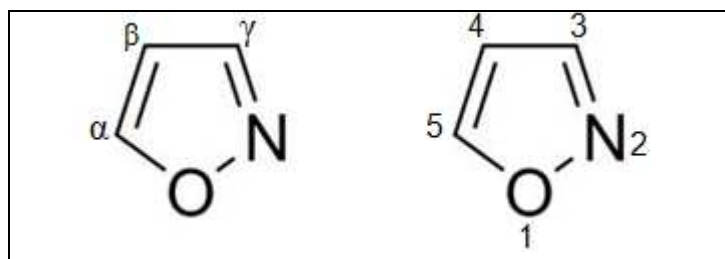
**Figura 24:** Estrutura do anel pirazol

### 2. 3. 2. Isoxazóis e Isoxazolinonas

A química de isoxazóis data de 1888, quando Claisen (CLAISEN & LOWMAN, 1888) propôs a correta estrutura (3-metil-5-fenil-isoxazol) para o composto sintetizado anos antes (CERESOLE, 1884) a partir da ação de hidroxilamina em benzoílaceton. Ele sugeriu o nome monoazol para o anel de cinco membros  $C_3NO$ , que foi modificado por Hantsch (HANTSCH, 1888) para isoxazol, um nome derivado do já conhecido anel isomérico oxazol. Em 1891, Claisen publicou seu artigo clássico “Ueber Isoxazole” (CLAISEN, 1891), no qual o perfil fundamental da química de isoxazol foi relatado.

Do ponto de vista histórico, é interessante notar que dois isoxazóis (*eulite* e *dislilite*) foram isolados em 1852 (BAUP, 1852) a partir da reação de ácido nítrico concentrado com ácido citracônico. Contudo, suas estruturas permaneceram desconhecidas por um longo tempo, e não demonstraram ser polinitro derivados de isoxazol e 3,3'-diisoxazol, respectivamente, até 1946 (QUILICO et al, 1946; FUSCO & ZUMIN, 1946).

O nome trivial isoxazol, originalmente proposto por Hantsch, foi adotado pela IUPAC e é usado em resumos químicos, embora a nomenclatura mais sistemática 1,2-azol seja usada ocasionalmente por alguns autores. As três posições do anel disponíveis para substituição foram originalmente indicadas como na estrutura A, utilizando as letras gregas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , iniciando a partir da posição adjacente ao átomo de oxigênio. A nomenclatura persistiu até os anos de 1950, após, a numeração começou a partir do átomo de oxigênio, como mostrado na estrutura B, que hoje em dia, é usada exclusivamente.



Estrutura A

Estrutura B

**Figura 25:** Estruturas do anel isoxazol

Poucos compostos com o anel isoxazol foram encontrados em fontes naturais: ácido ibotênico e muscimol, isolados da *Amanita muscaria* (BOWDEN & DRYSDALE, 1965; EUGSTER et al, 1965), *A. pantherina* (ONDA et al, 1964; TAKEMOTO et al, 1964) e *A. catharnata* (CHILTON & OTT, 1976), que possuem atividades inseticida e anti-depressiva (EUGSTER, 1969), o pigmento muscaurina de *A. muscaria* (DÖPP et al, 1982) e o regulador de crescimento de plantas triunfereol ou 4-hidroxiisoxazol, isolado de folhas de *Triumfetta rhomboidea* (Tiliácea) (KUSUMI et al, 1981). Além disso, 4,5-dimetil-isoxazol tem sido detectado em óleos voláteis de suco de tomate (WOBEN et al, 1974) e em compostos voláteis de lecitina comercial de soja (KIM et al, 1984), e trimetil-isoxazol está presente em porções etéreo-solúveis de fumaça de cigarro condensada (NEWELL et al, 1978).

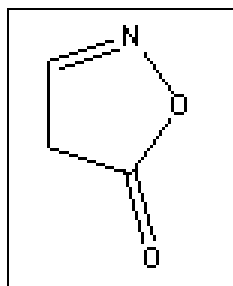
A química de derivados isoxazólicos está em intenso desenvolvimento devido a sua ampla aplicação na síntese de vários compostos orgânicos e atividades biológicas de inúmeros representantes desta classe de heterociclos. A funcionalização do anel isoxazol é um dos caminhos mais práticos para obter novos compostos que podem ser promissores como substâncias com potencial biologicamente ativo. Entre os isoxazóis funcionalmente substituídos, seus derivados amino atraem forte interesse como compostos de partida para a síntese de vários sistemas heterocíclicos condensados, bem como agentes citostáticos, anticonvulsivos, fungicidas, herbicidas e outros produtos bioativos (POTKIN et al, 2009).

O anel de 5 membros isoxazol provém uma valiosa base para a química medicinal bem como é um útil sinton em síntese orgânica (PINHO & MELO, 2005). Além disso, o isoxazol aromático mostra uma vasta gama de atividades biológicas,

incluindo aplicações farmacológicas como atividades hipoglicêmica, analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana e inibidora do vírus HIV, bem como aplicações agroquímicas como atividades herbicida, fungicida, e inseticida (HERRMANN et al, 1999).

As isoxazolinonas são da classe de oxazolidinonas, compostos muito utilizados como antibióticos. O anel da estrutura de isoxazolinona tem uso limitado em química medicinal, presumivelmente devido às instabilidades inerentes a ligação N-O, propriedades potenciais para adição de Michael e labilidade hidrolítica da carbonila do anel (SNYNDER et al, 2004).

O primeiro composto oxazolidinona usado foi a cicloserina, pertencente à segunda linha de drogas contra tuberculose (FRAHM et al, 1999). Algumas das mais importantes oxazolidinonas constituem a última geração de antibióticos usados contra patógenos gram-positivos como *Staphylococcus aureus*. Muitos estudos têm sido empregados nessa área, entretanto a primeira e única oxazolidinona disponível comercialmente para o tratamento de infecções bacterianas pela presença de microorganismos gram-positivos é Linezolid (Zyvox®) (QUESNELLE et al, 2005).



**Figura 26:** Estruturas do anel isoxazolinona

### 3. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra aqui organizado.

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. As apresentações estão baseadas no manuscrito que será submetido para publicação na revista Cell Biology and Toxicology.

**3. 1. Manuscrito:** Kinetic analysis of inhibition of some azoles compounds on acetylcholinesterase activity from rats brain.

### 3. 1. Manuscrito

#### **Kinetic analysis of inhibition of some azoles compounds on acetylcholinesterase activity from rats brain.**

Jonas Daci da Silva Serres<sup>1</sup>, Roberta Schmatz<sup>1</sup>, Amanda Maino Fiorenza<sup>1</sup>,  
Eduardo José Machado Dutra<sup>1</sup>, Luciana Tavares<sup>1</sup>, Rosélia Maria Spanevello<sup>2</sup>,  
Andréia Machado Cardoso<sup>1</sup>, Fátima Husein Abdalla<sup>1</sup>, Mara Elisa Fortes  
Braibante<sup>1</sup>, Maria Rosa Chitolina Schetinger<sup>1</sup>, Vera Maria Melchiors Morsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

\*Corresponding authors

Address correspondence and reprint requests to:

Jonas Daci da Silva Serres (jdserres@yahoo.com.br) Tel: + 55- 55- 32209557

Vera Maria Melchiors Morsch (veramorsch@gmail.com) Tel: + 55-55-32209557



## Abstract

The acetylcholinesterase enzyme is responsible for the acetylcholine hydrolysis in the synaptic cleft during the transmission of nervous impulse. The investigation of new inhibitors of this important enzyme is very relevant on tentative to minimize the effects due damages on cholinergic transmission, mainly in pathologies as Alzheimer's disease. Therefore, this work has investigated the inhibitory potential of different classes of heterocyclic compounds (pyrazole, isoxazole and isoxazolinone), *in vitro*, on the acetylcholinesterase activity on different cerebral structures of rats (cortex, striatum and hippocampus). Among all tested compounds, only the 5-(4-methoxy-phenyl)-3-methyl-isoxazole (**2c**) compound did not show any inhibition; all the remaining compounds showed inhibition ( $p < 0,05$ ), and the compounds 3-methyl-5-phenyl-isoxazole (**2a**) and 3-*p*-(methoxy)-phenyl-5-isoxazolinone (**3c**), that shown the best inhibitory efficacy (53 and 59 %, respectively), were the compounds selected to the kinetic enzymatic assays. From these results it was possible to characterize the kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{MAX}$ ) and the inhibition type showed by every compound through the Lineweaver-Burk and Cornish-Bowden plots. The mentioned parameters to the compound **2a** were  $K_m = 0.2$  mM and  $V_{MAX} = 7.94$   $\mu$ moles ASCh/h/mg of protein. The compound exhibited a competitive inhibition type with  $K_i = 1.46$  mM. For the compound **3c**, the values of  $K_m$  and  $V_{MAX}$  were 0.05 and 1.42  $\mu$ moles ASCh/h/mg of protein, respectively. This compound performed a noncompetitive inhibition type with  $K_i = 2.2$  mM. All the compounds were previously diluted in methanol PA at concentrations of 0.031 mM, 0.0625 mM, 0.125 mM, 0.250 mM and 0.500 mM.

**Key Words:** acetylcholinesterase; heterocyclic; inhibition; kinetic

## Introduction

Cholinergic neurons and their projections are widely distributed throughout the central nervous system (CNS) with an essential role in many vital functions, such as learning and memory, in which two different types of cholinesterase, acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), and butyrylcholinesterase (BuChE) are ubiquitous constituents (Mesulan et al, 2002).

Of the particular interest, AChE is the enzyme that inactivates the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the synaptic cleft of cholinergic synapses and neuromuscular junctions (Appleyard, 1992). In addition to this function, evidence has demonstrated that this enzyme has noncholinergic, synaptic, and extrasynaptic roles during neural development (Soreq and Seidman, 2001; Silman and Sussman, 2005), as cell proliferation (Appleyard, 1992) and neurite outgrowth (Chacón et al, 2003). Interestingly, AChE also is related to various insults including oxidative stress, an important event that has been related to the pathogenesis of a variety of CNS disorders, such as stroke (Ozkul et al, 2007), Alzheimer's disease (AD) (Chauhan and Chauhan, 2006) and others.

Researches involving the AChE activity have been studied since the discovery of the cholinergic hypothesis, wherein learning memory and behavior deficits seem to be related to loss of cholinergic transmission in hippocampus and cerebral cortex (Klafki et al, 2006). Although many promising new therapeutic options are being studied, acetylcholinesterase inhibitors remain the current frontline therapeutic approach to treatment of mild-to-moderate AD (Geldmacher et al, 2006). AD is the most common form of disabling cognitive impairment in the elderly, and its increasing prevalence reflects a growing aged population (Caselli et al, 2006).

AChE inhibitors (AChEIs) used on treatment of AD include tacrine, rivastigmine, donepezil and galantamine. Tacrine was the first acetylcholinesterase inhibitor approved for AD treatment (Crisman et al, 1994), but this pharmacy has been associated with some severe side effects, including hepatotoxicity, needing research and development of newer inhibitors with greater specificity and higher potency (Constantino et al, 2008). At present, commonly administered acetylcholinesterase inhibitors include rivastigmine, donepezil, and galantamine. Among these, galantamine possesses the dual mechanism of acetylcholinesterase inhibition and allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors (Samochocki et al, 2003).

Organophosphorus (OP) and carbamate (CB) pesticides are the most important AChE inhibitors and are often called anticholinesterases. In the presence of inhibitors, AChE becomes progressively inhibited and is not capable of hydrolyzing ACh to choline and acetic acid (Jokanovic and Maksimovic, 1997). Consequently, ACh accumulates at cholinergic receptor sites and produces effects equivalent to excessive stimulation of cholinergic receptors throughout the central and peripheral nervous system (Jokanovic, 2009).

Both substrate and inhibitors react covalently with the esterases essentially in the same manner, because acetylation of serine residue at AChE catalytic site is analogous to phosphorylation or carbamylation. In contrast to the acetylated enzyme which rapidly separates acetic acid and restores the catalytic site, the phosphorylated enzyme is stable. Inhibited enzyme can be spontaneously reactivated at different rates depending on the compound—for CB it occurs very rapidly with half-time of one hour or less, while for OP having branched alkyl groups it may occur at a very slow rate (Jokanovic, 2009). Likewise OP and CB,

other classes of organic compounds are able to inhibit the AChE; however they do it in a reversible way. Examples are some compounds belonging to the heterocyclic class which are known to inhibit the enzyme such as tacrine (aminoacridine) and donepezil (piperidine) (Jeffrey & Cummings, 2000).

The heterocyclic class includes a myriad of compounds that assemble themselves by structural similarities, for example, the pyrazole, isoxazole and isoxazolinone, which are heterocyclic compounds formed by a five members ring, whose structural difference is the kind of heteroatom(s): pyrazole possess two nitrogen atoms bounded by adjacent binding; isoxazole possess one oxygen and one nitrogen as heteroatoms, also linked by adjacent binding; isoxazolinone possess a carbonyl bounded to the isoxazolic nucleus. These kind of compounds have some biological activity (pyrazole possess antidiabetic and antiviral activities (Ouyang et al, 2008); isoxazole are used as antilipidemics (Herrmann et al, 1999); isoxazolinone are used as antibiotics (Quesnelle et al, 2005)), but few of these compounds have been tested in the evaluation of the AChE activity.

Considering previous studies with pyrazolic compounds, which showed inhibition of the AChE enzyme, and also due the biological potential of the isoxazole and isoxazolinone, that have almost any study related to the AChE, the investigation of the heterocyclic compounds effects on activity of this important enzyme becomes indispensable. The purpose of this study was to investigate the *in vitro* effect of eleven heterocyclic compounds of three subclasses (pyrazole, isoxazole and isoxazolinone) on the AChE activity from different brain structures of rats (cerebral cortex, striatum and hippocampus) in order to evaluate the kind of inhibition and the kinetic parameters involving such interactions.

## Materials and methods

### Chemicals

Acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris (hydroxymethyl)-aminomethane GR, *EeAChE* from *Electrophorus electricus* (type V-S) and methanol PA were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity. The compounds tested to evaluate the AChE activity were synthesized according to Valduga et al (1999) and Braibante et al (2007). They are shown on the figure 1 and the respective nomenclatures are displayed on table I.

### Animals

Adult male Wistar rats (70-90 days; 150–250 g) were used. The animals were maintained at a constant temperature ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. The study was approved in accordance with the University Ethics Committee Guidelines for experiments with animals.

### Brain Tissue Preparation

Animals were underwent to euthanasia by decapitation and brain structures were immediately removed and separated into cerebral cortex (CC), striatum (ST) and hippocampus (HP) and placed in a solution of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, on ice. The brain structures were homogenized in a glass potter in Tris-HCl solution and then centrifuged at 1000g for 10 minutes. Aliquots of resulting brain structure homogenates were stored at  $-8^\circ\text{C}$  until utilization. Protein was determined

previously and adjusted for each structure: CC (0.7mg/ml), ST (0.4 mg/ml) and HP (0.8 mg/ml) by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard solution.

#### AChE enzymatic Assay

AChE enzymatic assay was determined by the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961), with some modifications (Rocha et al. 1993). The assay medium (2 ml final volume) contained 100 mM K<sup>+</sup>-phosphate buffer, pH 7.5, and 1 mM 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid. One hundred microliters of enzyme preparation from the brain structures and the purified form were pre-incubated for 2 min with each compound. The concentrations of all the compounds used were 0; 0.031; 0.062; 0.125; 0.250 and 0.500 mM, on methanol PA. After pre-incubation for 2 min with the respective compound the reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide as the substrate and the hydrolysis was monitored for the formation of thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 2 minutes (intervals of 20s). All samples were run in duplicate or triplicate. For the *EeAChE* evaluation firstly, it was selected a suitable concentration of AChE, at which the relationship between the initial velocity and the concentration of AChE ([AChE]) should be linear (Chen and Zhou, 2001; Kamal et al., 2000). Secondly, the AChE activity was determined according to Ellman method described above. The enzyme activity was expressed in  $\mu\text{moles AcSCh/h/mg}$  of protein, to the AChE from brain and U/h/ml to the *EeAChE*.

#### Kinetic Parameters

The interaction between the compounds **2a** and **3c** with AChE activity and the values of the Michaelis – Menten constant ( $K_m$ ) were determined using the Lineweaver-Burk (1934) double reciprocal plot, by plotting  $1/V$  against  $1/S$  analyzed over a range of substrate acetylthiocholine concentrations (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mM) in the absence and in the presence of **2a** and **3c**. Concentrations of 0, 0.125, 0.250, 0.500 and 1.0 mM were used to both compounds. The kinetic interaction between **2a** and AChE was evaluated in the striatum while that of **3c** was evaluated only in the cerebral cortex. To compare the results, the evaluation of the kinetic parameters was also performed using purified acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (Sigma, type V – S). The values of inhibition constant ( $K_i$ ) were obtained using replot of data from Lineweaver-Burk plot of  $K_{m,app}$  versus  $[I]$  and the type of inhibition was characterized by Cornish–Bowden plots of  $S/V$  versus  $[I]$  (Cornish – Bowden, 1974).

#### Determination of $IC_{50}$ Values

The sample concentration showing 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) was calculated by plotting the inhibition percentages against the corresponding sample solution concentrations.

#### Statistical analysis

The statistical analysis used was one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test.  $P < 0.05$  was considered to represent a significant difference in the analyses. All data were expressed as mean  $\pm$  SEM.

## Results

The results showed that the compounds caused, at the least, a few inhibition of the AChE activity, except the compound **2c**, that did not show any inhibitory efficacy (Table II). The others compounds decreased significantly the activity of the enzyme ( $p < 0.05$ ) in cerebral cortex, striatum and hippocampus. However, only two compounds inhibited the enzyme strongly: the compound **2a**, whose the inhibition was verified on striatum (51%); and the compound **3c**, that decreased the AChE activity on cerebral cortex (59%).

These compounds were chosen for evaluating the kinetic parameters of enzymes from brain of rats and from *Electrophorus electricus*. These results are expressed on Table III. The  $IC_{50}$  obtained was 0.46 mM for **2a** and 0.41 mM for **3c**, to AChE from striatum and cortex, respectively. Regarding to *EeAChE*, the  $IC_{50}$  was 0.57 mM for **2a** and 0.62 mM for **3c**. The values of inhibition constant ( $K_i$ ) obtained using Cornish–Bowden plots of  $S/V$  versus  $[I]$  are shown in the Table IV.

Analysis of kinetic data indicated that the inhibition caused by **2a** in AChE activity, independent of the source, was competitive. The figure 2, a Lineweaver-Burk plot, confirms this inhibition type by the intersect of the straight lines on y-axis. The figure 3 shows a Cornish – Bowden plot where the parallel lines indicate a competitive inhibition.

On other hand, compound **3c** showed a noncompetitive inhibition of the AChE from cortex of rats and, at the same way, for *EeAChE*. The figure 4 is indicating that the lines part from negative x-axis, at a same point ( $-1/K_m$ ), displaying a noncompetitive inhibition type (note the different values of  $V_{max}$  that the intersect of the lines on y-axis indicates). To confirm this type of inhibition, the



figure 5 shows a Cornish – Bowden plot, with the lines intersecting on  $-x$ -axis. The value of  $K_i$  is obtained by this method, as can be seen on the graph.

## Discussion

Works conducted with different inhibitors for the treatment of AD and in different isoforms in the brain have been promising along the years (Mimori et al 1997; Das et al, 2001; Comet et al, 2005; Das et al, 2005). According to the data showed in this study, it can be observed that there was no obvious standard of inhibition of the enzyme AChE from rat brain. This is clear when it considers as a comparative criterion the analysis of the inhibition caused by compounds of the same class. Analyzing the results of the pyrazole class it can be observed that the structural analogues **1a** and **1b** displayed AChE inhibition from striatum and cortex, however the stereoisomer of **1b**, the compound **1c**, has inhibited the enzyme only in cortex.

Considering that the active site of the enzyme is located at the bottom of a narrow gorge (Dvir et al, 2010) and that there are different isoforms of this enzyme in mammalian brains (Massoulie et al, 1982) this difference in inhibition level can be related with the information that there is a selectivity of the compound **1b** for the enzyme forms present in both cortex and striatum; since the difference in configuration of the compound **1c** (R) can produce some steric hindrance when it is associated with the enzyme, preventing its effective binding with some isoform present in striatum. Similarly, this conformational difference between the two compounds may serve to explain why only one of them inhibits the enzyme in a sole brain structure, while the other does not distinguish between structures and inhibits the enzyme equivalently.

Taking as a comparative parameter only the inhibition, independent of the structure, it can be noted that the structural similarity among the three pyrazole compounds can also explain how they inhibited the enzyme. There are phenyl groups as well as hydrophobic chains in their structures. It is known that the access to the channel of the active site of AChE is surrounded by aromatic and hydrophobic amino acid residues (Dvir et al, 2010), which leads to assume that  $\pi$ -cation interactions between the center of the aromatic compounds and amino acids enzyme and the hydrophobic interactions between side chains of both may have contributed to the inhibition by these compounds. These interactions may have decreased the affinity of the enzyme for its substrate, since the inhibition produced was not significant. Studies relating the alkaloid Huperzine-A with the inhibition of AChE show that the presence of such interactions may influence the degree of inhibition displayed (Zangara et al, 2003).

The analysis of the compounds **1d**, **2b** and **3b**, which differ structurally in the heterocyclic nuclei and resemble the substituents (all have a p-methyl-phenyl group attached to the heterocyclic ring, and compounds **1d** and **2b** show a further methyl also connected to the ring), shows that the pyrazolic compound inhibited the enzyme only in the striatum, the isoxazolinonic compound inhibited in cortex and isoxazol inhibited the enzymes of both structures. Again, the discrepancy regarding to the presence or absence of inhibition is related, possibly the selectivity that the compounds presented by the isozymes. As can be seen, the compound **2b** did not show selectivity to any isoform. The compounds **2a** and **3a**, that differ in the class (of both substituents are phenyl groups), there is a certain preference for different isoforms of the enzyme since one inhibited AChE in striatum (**2a**) and the other inhibited of the cortex (**3a**). Likewise, compounds **2c**

and **3c** show different profiles of inhibition: the compound **2c** did not inhibit any structure and **3c** inhibited cortex and striatum. The presence of the cluster p-methoxy-phenyl in these compounds did not interfere in how they interacted with the enzyme, since one of them inhibited the enzyme and the other did not. In this case, it becomes necessary to compare compounds concerning the classes which they belong.

The compounds of the isoxazole class showed some peculiarities in the degree of inhibition: of the same way that one compound of this class did not inhibit the enzyme in any structure (**2c**), another inhibited in all (**2d**), including the hippocampus, it is the only compound of eleven to inhibit the enzyme that brain structure. Comparing the compounds **2c** and **2d**, the presence of groups that interact differently with the aromatic ring of the substituent (p-methoxy group in **2c** is an activator; p-nitro in **2d** is a deactivator) is observed. This fact could serve as a criterion for evaluating such a big difference between the inhibitory profiles of both. Studies involving terpenoid compounds and AChE show that differences between the substituents of the same class of compounds can significantly alter the inhibitory efficiency of these (Choudhary et al, 2006; Sauvaître et al, 2007).

This is consistent with the results obtained also for the heterocycles tested in this study: the isoxazolinones. For these compounds, only the **3a** did not inhibit the striatum enzyme. The other two compounds, **3b** and **3c**, reasonably inhibited the enzyme in both brain structures, showing that the presence of activating groups in the ring of substituent, may have led to a better interaction between the enzyme and inhibitors. Groups supposed as ring activators contribute to increase the reactivity of the aromatic ring making it through the resonance structures formed. Therefore it can interact with neighboring groups of compounds such as

amino acid residues. This may be a likely explanation for the inhibition produced by this heterocyclic class. Moreover, the presence of a hydrolytically labile carbonyl in the chemical structure of these compounds may help to discriminate the inhibition of the compounds **3c** and **2c**, since both have a strong activator group in the ring and no inhibition of the enzyme for the isoxazole was verified.

Of all the tested compounds, only two effectively inhibited the enzyme and these two compounds, **2a** and **3c**, were chosen for the evaluation of the kinetic parameters of AChE. As can be seen, these compounds exhibited two different types of inhibition: the compound **2a** competitively inhibited the enzyme from striated; compound **3c** showed a noncompetitive inhibition type of the AChE in the cortex. Although these two compounds did not inhibit the enzyme efficiently in all brain structures, it is possible to note that compared to the purified form of the enzyme from *Electrophorus electricus*, they displayed the same type of inhibition that showed in the respective brain structure: competitive for the compound **2a** and the noncompetitive for the compound **3c**. Whereas the main form of *EeAChE* is asymmetrical linked to collagen, A12 (Massoulie et al, 1982) and that the major isoforms of AChE from the brains of rats are those of the globular type G1, G2 and G4 (Rieger & Vigny, 1976) can be inferred that, obviously there was a selectivity of the compounds by different globular forms of the enzyme.

More studies are required to assess which of these forms were inhibited and by which compounds, however, just for showing such selectivity, these compounds may be useful in the evaluation of inhibition in different isoforms of this important enzyme. Therefore, it can be concluded that the investigation of new AChE inhibitors, as well as the study of their interactions with this enzyme need information quite cleared as the identification of the specific isoform present on the

different cerebral structures and researches involving molecular modeling to know how and where the inhibitor is acting. Additionally, the directed synthesis of AChE inhibitors will become a great tool on discovering drugs which can be used, someday, on treatment of pathologies related to cholinergic system.

### **Acknowledements**

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

Appleyard ME. Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *TINS*. 1992; 15: 485-490.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.

Braibante MEF, Braibante HTS, Tavares LC, Rohte SF, Costa CC, Morel AF, Stuker CZ, Burrow RA. *Synthesis*. 2007; 16: 2485.

Caselli RJ, Beach TG, Yaari R, Reiman EM. Alzheimer's disease a century later. *J Clin Psychiatry*. 2006; 67: 1784-1800.

Chacón M, Reyes AE, Inestrosa NC. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *J Neurochemistry*. 2003; 87: 195-204.

Chauhan V, Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*. 2006; 13: 95-208.

Chen SG, Zhou RQ. *Enzymology*. Fudan University Press, China. 2001.

Choudhary MI, Shahnaz S, Parveen S, Khalid A, Mesaik AM, Ayatollahi SAM, Rahman A. New Cholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus*

*hyrcana*. Chem biodiversity. 2006; 3: 1039-1052.

Cometa MF, Lorenzina P, Fortuna S, Volpea MT, Meneguza A, Palmery M. In vitro inhibitory effect of aflatoxin B1 on acetylcholinesterase activity in mouse brain. Toxicology. 2005; 206: 125–135.

Cornish-Bowden A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and noncompetitive inhibitors. Biochem Journal. 1974; 137: 143–144.

Costantino HR, Leonard AK, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. Intranasal administration of acetylcholinesterase inhibitors. BMC Neuroscience. 2008; 9 (suppl 3): S6.

Crismon ML. Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease. Ann Pharmacother. 1994; 28: 744-751.

Das A, Dikshit M, Nath C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. Life Sciences. 2001; 68: 1545–1555.

Das A, Dikshit M, Nath C. Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. Pharm, Biochem and Behavior. 2005; 81:89–99.

Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. Chem Bio Interactions. 2010; 187: 10–22.

Ellmann GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacology*. 1961; 7: 88-95.

Geldmacher DS, Frolich L, Doody RS, Erkinjuntti T, Vellas B, Jones RW, Banerjee S, Lin P, Sano M. Realistic expectations for treatment success in Alzheimer's disease. *J Nut Heal Aging*. 2006; 10: 417-429.

George T, Grossberg MD. Cholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Getting On and Staying On. *Cur Ther Research*. 2003; 64: No. 4.

Herrmann M, Ehrler J, Kayser H, Rindlisbacher A, Hofle G. Chemical modification of thiogazole A in the oxazole and styryl region. *Eur Jour Org Chemistry*. 1999; 1999: 3381–3392.

Jeffrey L, Cummings MD. Cholinesterase Inhibitors: A New Class of Psychotropic Compounds. *Am Jour Psychiatry*. 2000; 157: 4–15.

Jokanovic, M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxic Letters*. 2009; 109: 107-115.

Jokanovic M, Maksimovic M. Abnormal cholinesterase activity: understanding and interpretation. *Eur Jour Clin Chem Clin Biochemistry*. 1997; 35: 11–16.



Kamal MA, Greig NH, Alhomida AS, Al-Jafari, A.A. Kinetics of human acetylcholinesterase inhibition by the novel experimental Alzheimer therapeutic agent tolserine. *Biochem Pharmacology*. 2000; 60: 561–570.

Klafki HW, Staufenbiel M, Kornhuber J, Wiltfang J. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain*. 2006; 129: 2840-2855.

Lineweaver B, Burk D. The enzyme dissociation constants. *J Am Chem Society*. 1934; 56: 658-666.

Massoulie J and Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann Rev Neuroscience*. 1982; 5: 57-106.

Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. *Neuroscience*. 2002; 110: 627-639.

Mimori Y, Nakamura S, Yukawa M. Abnormalities of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease with special reference to effect of acetylcholinesterase inhibitor. *Beh Brain Research*. 1997; 83: 25-30.

Ouyang G, Chen Z, Cai XJ, Song BA, Bhadury PS, Yang S, Jin LH, Xue W, Hu DY, Zeng S. Synthesis and antiviral activity of novel pyrazole derivatives containing oxime esters group. *Bioorg Med Chemistry*. 2008; 16: 9699–9707.

Ozkul A, Akyol A, Yenisey C, Arpaci E, Kiylioglu N, Tataraglu, C. Oxidative stress in acute ischemic stroke. *J Clin Neuroscience*. 2007; 14: 1062-1066.

Quesnelle CA Gill P, Roy S, Dodier M, Marinier A, Martel A, Snyder LB, D'Andrea VS, Bronson JJ, Frosco MB, Beaulieu D, Warr GA, DenBleyker KL, Stickle TM, Yang H, Chaniewski SE, Ferraro CA, Taylor D, Russell JW, Santone KS, Clarke J, Drain RL, Knipe JO, Mosureb K, Barrett JF. Biaryl isoxazolinone antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Letters*. 2005; 15: 2728–2733.

Rieger P, Vigny M. Solubilization and physicochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase: Development and maturation of its molecular forms. *J Neurochemistry*. 1976; 27: 121-129.

Rocha JBT, Emanuelli T, Pereira ME. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol Experimentalis*. 1993; 53: 431-437.

Samochocki M, Höffle A, Fehrenbacher A, Jostock R, Ludwig J, Christner C, Radina M, Zerlin M, Ullmer C, Pereira EF, Lubbert H, Albuquerque WX, Maelicke A. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not

muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharm Exp Therapy*. 2003; 305: 10254-1036.

Sauvaître T, Barlier M, Herlem D, Gresh N, Chiaroni A, Guenard D, Guillou C. New potent acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene series. *J Med Chemistry*. 2007; 50: 5311-5323.

Silman I, Sussman J. Acetylcholinesterase: classical and non classical functions and pharmacology. *Cur Opin Pharmacology*. 2005; 5: 293-302.

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase - new roles for and old actor. *Nat Rev Neuroscience*. 2001; 2: 294-302.

Valduga CJ, Santis DB, Braibante HSB and Braibante MEFB. *J. Heter Chemistry*. 1999; 36: 505.

Zangara, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharm, Biochem Behavior*. 2003; 75: 675–686.

## Legends of figures and tables

Figure 1- Chemical structures of the tested compounds. 1a, 1b, 1c and 1d are pyrazoles; 2a, 2b, 2c and 2d are isoxazoles; 3a, 3b and 3c are isoxazolinones

Figure 2- Lineweaver-Burk plots for compound 2a on AChE activity from striatum of rats (A) or *Electrophorus electricus* (B).  $1/V_{\max}$  versus  $1/[\text{acetylthiocholine}]$  in the presence of various concentrations of inhibitor: ( $\blacktriangle$ ) 0  $\mu\text{M}$ , ( $\bullet$ ) 125  $\mu\text{M}$ , ( $\blacklozenge$ ) 250  $\mu\text{M}$ , (+) 500  $\mu\text{M}$ , ( $\blacksquare$ ) 1000  $\mu\text{M}$ .

Figure 3- Cornish – Bowden plots for compound 2a on AChE activity from striatum of rats (A) or *Electrophorus electricus* (B).  $1/[\text{3-methyl-5-phenyl-isoxazole}]$  versus  $[\text{acetylthiocholine}]/v$  in the presence of various concentrations of substrate: ( $\blacktriangle$ ) 0.01 mM, ( $\bullet$ ) 0.1 mM, ( $\blacklozenge$ ) 0.5 mM, (+) 1 mM.

Figure 4- Lineweaver-Burk plots for compound 3c on AChE activity from cerebral cortex of rats (A) or *Electrophorus electricus* (B).  $1/V_{\max}$  versus  $1/[\text{acetylthiocholine}]$  in the presence of various concentrations of inhibitor: ( $\blacktriangle$ ) 0  $\mu\text{M}$ , ( $\bullet$ ) 125  $\mu\text{M}$ , ( $\blacklozenge$ ) 250  $\mu\text{M}$ , (+) 500  $\mu\text{M}$ , ( $\blacksquare$ ) 1000  $\mu\text{M}$ .

Figure 5- Cornish – Bowden plots for compound 3c on AChE activity from cerebral cortex of rats (A) or *Electrophorus electricus* (B).  $1/[\text{3-(p-methoxy)-phenyl-5-isoxazolinone}]$  versus  $[\text{acetylthiocholine}]/v$  in the presence of various concentrations of substrate: ( $\blacktriangle$ ) 0.01 mM, ( $\bullet$ ) 0.1 mM, ( $\blacklozenge$ ) 0.5 mM, ( $\blacksquare$ ) 1 mM. The value of  $K_i$  constant may be determined easily on the graphs to a noncompetitive inhibition.

**Table I** Nomenclature of the tested compounds.

Compound	Class	Nomenclature
1a	Pyrazole	1,5-diphenyl-3-benzilamine pyrazole
1b	Pyrazole	3-[S-(-)- $\alpha$ -phenylethylamine]-1,5- diphenyl pyrazole
1c	Pyrazole	3-[R-(+)- $\alpha$ -phenylethylamine]-1,5- diphenyl pyrazole
1d	Pyrazole	5-methyl-3- <i>p</i> -methyl-phenyl- pyrazole
2a	Isoxazole	3-methyl-5-phenyl-isoxazole
2b	Isoxazole	3-methyl-5- <i>p</i> -methyl-phenyl- isoxazole
2c	Isoxazole	5-(4-methoxy-phenyl)-3-methyl- isoxazole
2d	Isoxazole	5-methyl--3-( <i>p</i> -nitro-phenyl)- isoxazole
3a	Isoxazolinone	3-phenyl-5-isoxazolinone
3b	Isoxazolinone	3-( <i>p</i> -methyl)-phenyl-5- isoxazolinone
3c	isoxazolinone	3-( <i>p</i> -methoxy)-phenyl-5- isoxazolinone

**Table II** AChE activity in the presence of the pyrazole, isoxazole and isoxazolinone compounds in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of the rats measured at various concentrations.

Compound	Concentration $\mu$ M	Brain regions		
		<i>Cortex</i>	<i>Striatum</i>	<i>Hippocampus</i>
<b>1a</b>	0	2,82 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	15,14 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	1,46 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
	31	2,65 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	14,91 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>	1,51 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
	62	2,51 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	14,34 $\pm$ 2,99 <sup>a</sup>	1,48 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
	125	2,14 $\pm$ 0.08 <sup>bc</sup>	14,90 $\pm$ 2,79 <sup>a</sup>	1,39 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
	250	1,83 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	14,65 $\pm$ 2,21 <sup>a</sup>	1,54 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
<b>1b</b>	500	2,81 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	12,95 $\pm$ 2,55 <sup>b</sup>	1,69 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
	0	3,76 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	10.12 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2,11 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>

<b>1c</b>	31	3,26 ±0.09 <sup>bc</sup>	5.67 ±0.08 <sup>b</sup>	1,80 ±0.17 <sup>a</sup>
	62	3,00 ±0.23 <sup>c</sup>	6.45 ±0.13 <sup>bc</sup>	1,67 ±0.12 <sup>a</sup>
	125	3,03 ±0.20 <sup>c</sup>	6.78 ±0.74 <sup>bc</sup>	1,62 ±0.15 <sup>a</sup>
	250	3,46 ±0.15 <sup>b</sup>	6.64 ±0.95 <sup>c</sup>	1,46 ±0.09 <sup>a</sup>
	500	3,23 ±0.22 <sup>bc</sup>	6.89 ±0.48 <sup>c</sup>	1,31 ±0.12 <sup>a</sup>
<b>1d</b>	0	6,33 ±0.10 <sup>a</sup>	11,86 ±1,49 <sup>a</sup>	2,11 ±0.26
	31	4,90 ±0.14 <sup>b</sup>	8,33 ±0.33 <sup>a</sup>	2,03 ±0.26 <sup>a</sup>
	62	4,78 ±0.09 <sup>b</sup>	8,64 ±0.96 <sup>a</sup>	1,88 ±0.20 <sup>a</sup>
	125	4,81 ±0.09 <sup>b</sup>	9,29 ±0.56 <sup>a</sup>	1,94 ±0.21 <sup>a</sup>
	250	4,90 ±0.08 <sup>b</sup>	9,89 ±0.66 <sup>a</sup>	1,62 ±0.14 <sup>a</sup>
<b>2a</b>	500	4,66 ±0.07 <sup>b</sup>	9,86 ±0.67 <sup>a</sup>	1,77 ±0.20 <sup>a</sup>
	0	5,94 ±0.21 <sup>a</sup>	22,14 ±1,09 <sup>a</sup>	2,32 ±0.18 <sup>a</sup>
	31	6,30 ±0.22 <sup>a</sup>	20,23 ±1,02 <sup>a</sup>	2,43 ±0.18 <sup>a</sup>
	62	6,49 ±0.16 <sup>a</sup>	19,19 ±1,02 <sup>ab</sup>	2,02 ±0.13 <sup>a</sup>
	125	6,36 ±0.19 <sup>a</sup>	19,47 ±0,80 <sup>ab</sup>	2,09 ±0.12 <sup>a</sup>
<b>2b</b>	250	6,51 ±0.29 <sup>a</sup>	15,33 ±0,99 <sup>b</sup>	2,19 ±0.15 <sup>a</sup>
	500	5,13 ±0.11 <sup>a</sup>	16,76 ±0,65 <sup>b</sup>	2,38 ±2,08 <sup>a</sup>
	0	4,22 ±0.24 <sup>a</sup>	11,85 ±0.49 <sup>a</sup>	1,72 ±0.27 <sup>a</sup>
	31	4,28 ±0.22 <sup>a</sup>	9,75 ±1,00 <sup>ab</sup>	1,69 ±0.12 <sup>a</sup>
	62	4,38 ±0.20 <sup>a</sup>	9,12 ±1,26 <sup>ab</sup>	1,76 ±0.16 <sup>a</sup>
<b>2c</b>	125	4,24 ±0.21 <sup>a</sup>	8,72 ±0.66 <sup>b</sup>	1,75 ±0.08 <sup>a</sup>
	250	3,92 ±0.14 <sup>a</sup>	8,91 ±0.52 <sup>b</sup>	1,55 ±0.09 <sup>a</sup>
	500	4,00 ±0.20 <sup>a</sup>	5,53 ±0.69 <sup>b</sup>	1,45 ±0.08 <sup>a</sup>
	0	4.10 ±0.21 <sup>a</sup>	10,04 ±1,32 <sup>ab</sup>	0,98 ±0.07 <sup>a</sup>
	31	3.98 ±0.56 <sup>b</sup>	9,84 ±0.46 <sup>ab</sup>	0,97 ±0.08 <sup>a</sup>
<b>2d</b>	62	3.91 ±0.36 <sup>b</sup>	10,91 ±0.29 <sup>a</sup>	0,89 ±0.07 <sup>a</sup>
	125	3.84 ±0.45 <sup>b</sup>	8,89 ±0.45 <sup>b</sup>	0,91 ±0.08 <sup>a</sup>
	250	3.94 ±0.41 <sup>b</sup>	8,18 ±0.72 <sup>b</sup>	0,94 ±0.09 <sup>a</sup>
	500	3.92 ±0.24 <sup>b</sup>	9,69 ±0.20 <sup>ab</sup>	0,95 ±0.09 <sup>a</sup>
	0	4,54 ±0.11 <sup>a</sup>	16,91 ±1,58 <sup>a</sup>	1,94 ±0.08 <sup>a</sup>
<b>3a</b>	31	4,55 ±0.24 <sup>a</sup>	13,75 ±1,22 <sup>a</sup>	2,12 ±0.11 <sup>a</sup>
	62	4,68 ±0.15 <sup>a</sup>	14,00 ±0.83 <sup>a</sup>	2,18 ±0.14 <sup>a</sup>
	125	4,52 ±0.24 <sup>a</sup>	13,50 ±1,44 <sup>a</sup>	2,23 ±0.12 <sup>a</sup>
	250	4,52 ±0.24 <sup>a</sup>	13,37 ±1,19 <sup>a</sup>	1,92 ±0.31 <sup>a</sup>
	500	4,52 ±0.24 <sup>a</sup>	12,91 ±1,14 <sup>a</sup>	2,10 ±0.14 <sup>a</sup>
<b>3b</b>	0	4.15 ±0.14 <sup>a</sup>	8.18 ±1,54 <sup>a</sup>	1,78 ±0.09 <sup>a</sup>
	31	3.95 ±0.25 <sup>ab</sup>	7,41 ±0.84 <sup>ab</sup>	1,58 ±0.11 <sup>ab</sup>
	62	3.85 ±0.24 <sup>ab</sup>	6,43 ±0.65 <sup>b</sup>	1,56 ±0.10 <sup>ab</sup>
	125	3.71 ±0.52 <sup>ab</sup>	6,79 ±0.95 <sup>b</sup>	1,49 ±0.09 <sup>ab</sup>
	250	3.65 ±0.32 <sup>b</sup>	6,06 ±0.57 <sup>b</sup>	1,48 ±0.08 <sup>ab</sup>
<b>3a</b>	500	3.53 ±0.42 <sup>b</sup>	6,08 ±0.56 <sup>b</sup>	1,32 ±0.13 <sup>b</sup>
	0	3,45 ±0.51 <sup>a</sup>	21,35 ±1,25 <sup>a</sup>	2,27 ±0.08 <sup>a</sup>
	31	2,50 ±0.23 <sup>ab</sup>	18,10 ±1,31 <sup>a</sup>	2,56 ±0.11 <sup>a</sup>
	62	2,49 ±0.17 <sup>ab</sup>	18,55 ±0.83 <sup>a</sup>	2,38 ±0.09 <sup>a</sup>
	125	2,20 ±0.14 <sup>b</sup>	17,79 ±0.76 <sup>a</sup>	2,05 ±0.18 <sup>a</sup>
<b>3b</b>	250	3,25 ±0.17 <sup>a</sup>	18,70 ±1,64 <sup>a</sup>	2,46 ±0.11 <sup>a</sup>
	500	3,27 ±0.21 <sup>a</sup>	18,86 ±0.83 <sup>a</sup>	2,35 ±0.07 <sup>a</sup>
	0	4.21 ±0.45 <sup>a</sup>	7,38 ±1,67 <sup>a</sup>	0.84 ±0.08 <sup>a</sup>
	31	4.12 ±0.47 <sup>b</sup>	5,78 ±0.23 <sup>b</sup>	0.81 ±0.09 <sup>a</sup>

<b>3c</b>	62	3.94 ±0.54 <sup>ab</sup>	5,80 ±0.60 <sup>b</sup>	0.79 ±0.07 <sup>a</sup>
	125	3.85 ±0.24 <sup>b</sup>	5,87 ±0.47 <sup>b</sup>	0.82 ±0.06 <sup>a</sup>
	250	3.65 ±0.36 <sup>ab</sup>	6,07 ±0.67 <sup>b</sup>	0.81 ±0.08 <sup>a</sup>
	500	3.41 ±0.47 <sup>b</sup>	6,12 ±0.41 <sup>ab</sup>	0.84 ±0.07 <sup>a</sup>
	0	5,37 ±0.26 <sup>a</sup>	16,13 ±2,10 <sup>a</sup>	2,27 ±0.08 <sup>a</sup>
	31	4,94 ±0.26 <sup>a</sup>	16,22 ±1,62 <sup>a</sup>	2,13 ±0.20 <sup>a</sup>
	62	4,50 ±0.20 <sup>b</sup>	14,69 ±1,65 <sup>ab</sup>	2,28 ±0.19 <sup>a</sup>
	125	4,10 ±0.16 <sup>bc</sup>	13,32 ±0.72 <sup>b</sup>	2,18 ±0.15 <sup>a</sup>
	250	4,12 ±0.20 <sup>bc</sup>	12,59 ±0.65 <sup>b</sup>	2,05 ±0.17 <sup>a</sup>
	500	2,20 ±0.13 <sup>c</sup>	12,36 ±0.64 <sup>b</sup>	1,85 ±0.14 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Different letters show difference between groups

**Table III**  $K_m$  and  $V_{max}$  values for AChE activity from different sources in the presence of the compounds **2a** and **3c**.

Enzyme measured	Compound	$K_m$ (mM)	$V_{max}$
AChE <sup>a</sup>	2a	0.2	7.94
	3c	0.05	1.42
EeAChE <sup>b</sup>	2a	0.065	130
	3c	0.074	185

<sup>a</sup>AChE from striatum (compound 2a) and cortex (compound 3c) of rats.

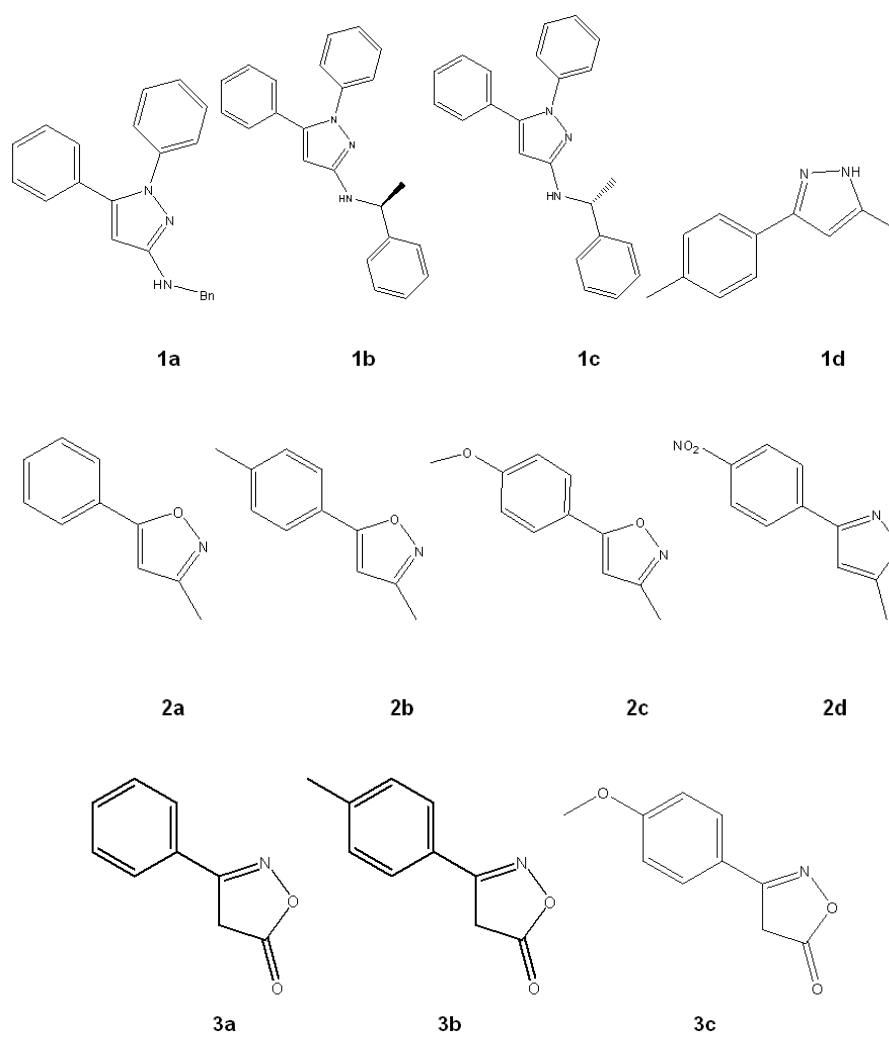
<sup>b</sup>AChE from *Electrophorus electricus*.

**Table IV**  $K_i$  and  $IC_{50}$  values for **2a** and **3c** compounds on inhibition of AChE activity.

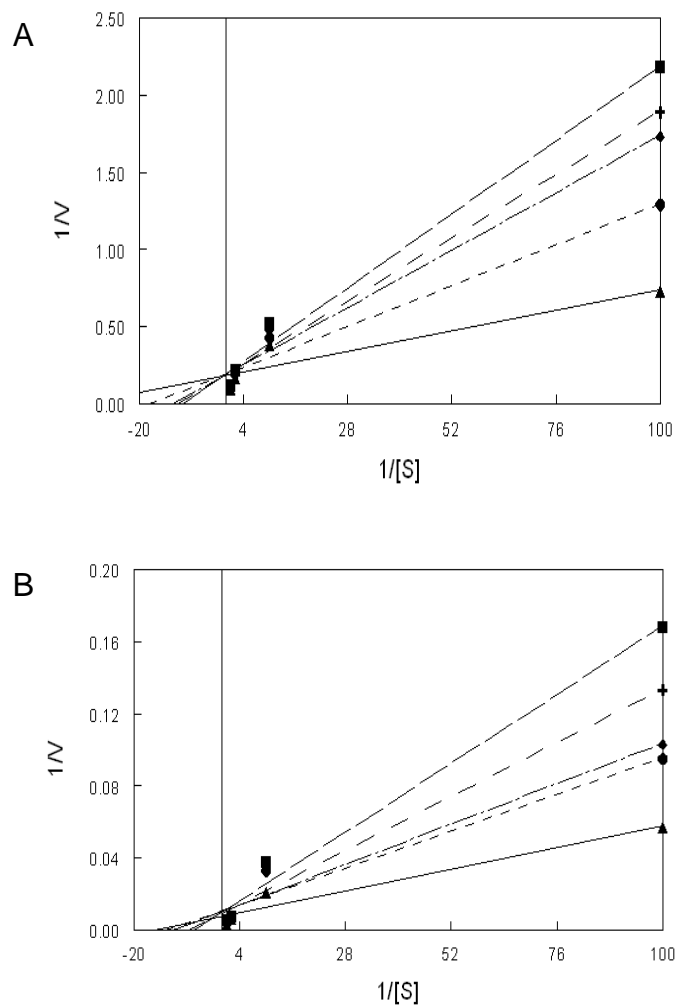
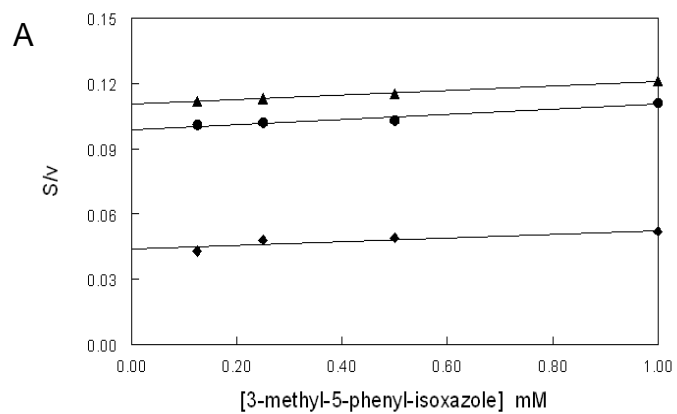
Enzyme measured	Compound	$K_i$ (mM)	$IC_{50}$ (mM)
AChE <sup>a</sup>	2a	1.46	0.46
	3c	2.2	0.41
EeAChE <sup>b</sup>	2a	0.76	0.57
	3c	2.8	0.62

<sup>a</sup>AChE from striatum (compound 2a) and cortex (compound 3c) of rats.

<sup>b</sup>AChE from *Electrophorus electricus*.

**Figure 1**



**Figure 2**

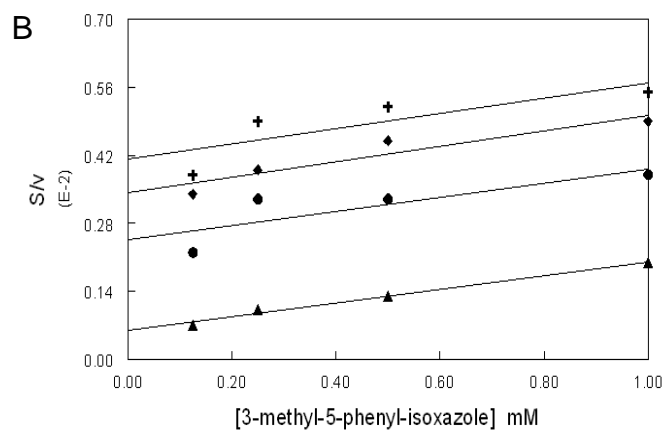


Figure 3

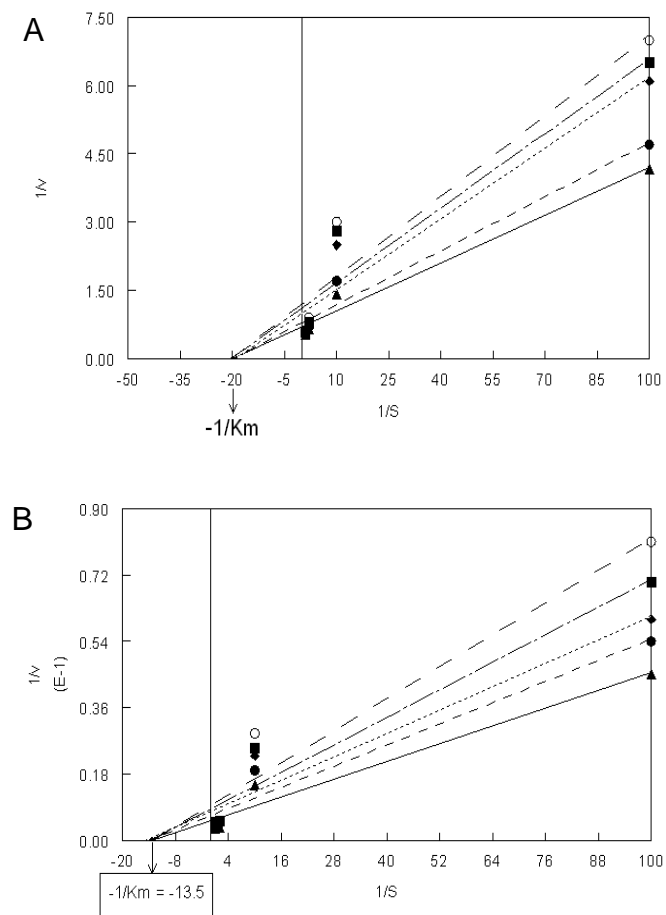


Figure 4

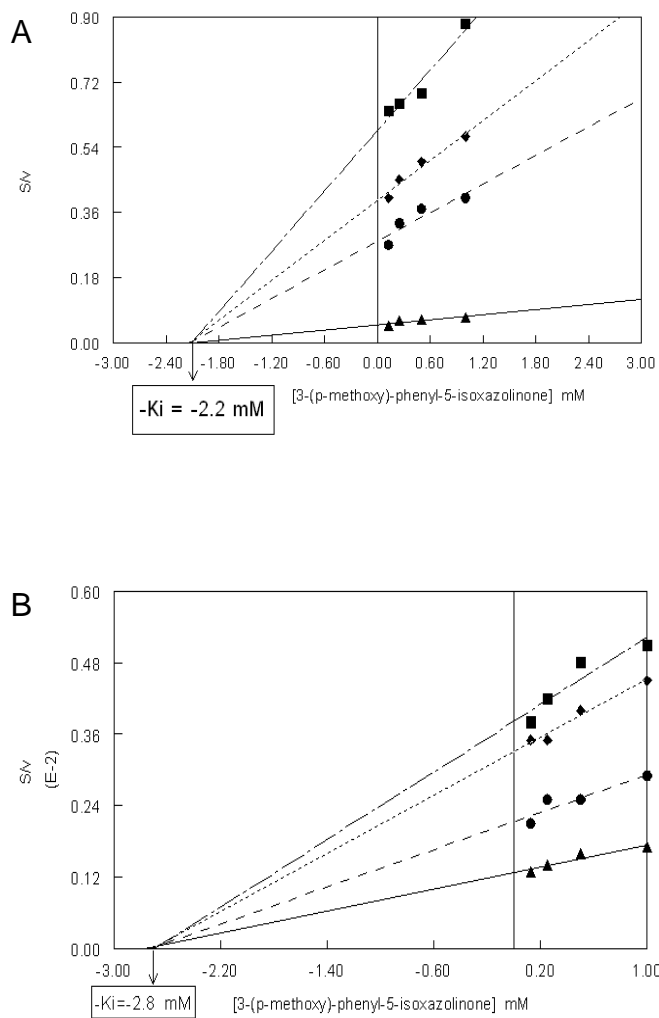


Figure 5

## 4. DISCUSSÃO

Trabalhos realizados com diferentes inibidores usados no tratamento da DA e em diferentes isoformas do cérebro têm sido promissores ao longo dos anos (Mimori et al, 1997; Das et al, 2001; Cometa et al, 2005; Das et al, 2005). De acordo com os dados apresentados neste estudo, pode-se observar que não houve um padrão claro de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase, tanto purificada quanto oriunda de cérebros de ratos. Isso fica claro quando se toma como critério comparativo a análise da inibição provocada por compostos de mesma classe. Analisando os resultados da classe dos pirazóis pode-se notar que os análogos estruturais **1a** e **1b** apresentaram inibição da enzima de estriado e córtex, porém o estereoisômero de **1b**, o composto **1c**, inibiu a enzima apenas no córtex.

Levando em consideração que o sítio ativo da enzima está localizado no fundo de um canal estreito (DVIR et al, 2010) e que há diferentes isoformas desta enzima em cérebros de mamíferos (MASSOULIE et al, 1982), pode-se relacionar esta diferença de grau de inibição com o fato de haver uma seletividade do composto **1b** pelas formas da enzima presentes tanto em córtex quanto em estriado, já a diferença de configuração do composto **1c** (R) pode produzir um certo impedimento estérico quando este se associa com a enzima, impedindo sua ligação efetiva com a mesma. Da mesma forma, essa diferença conformacional entre os dois compostos pode explicar por que um deles inibe somente a enzima de uma estrutura cerebral, enquanto a outra não faz distinção entre as estruturas e inibe a enzima equivalentemente.

Tomando como parâmetro comparativo apenas a inibição provocada, independente da estrutura, nota-se que a semelhança estrutural entre os três compostos pirazólicos também pode explicar como eles inibiram a enzima. Percebe-se a presença de grupamentos fenila além de cadeias hidrofóbicas em suas estruturas. É conhecido que o canal de acesso ao sítio ativo da AChE é circundado por resíduos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (DVIR et al, 2010), o que leva a pressupor que interações cátion- $\pi$  entre os centro aromáticos dos compostos e os aminoácidos da enzima e interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais de

ambos possam ter colaborado para a inibição apresentada por estes compostos. Essas interações podem ter diminuído a afinidade da enzima pelo seu substrato, uma vez que a inibição produzida não foi considerável. Estudos relacionando o alcalóide huperzina-A com a inibição da AChE mostram que a presença de tais interações pode influenciar no grau de inibição apresentado (ZANGARA et al, 2003).

Continuando a comparação em nível estrutural dos compostos, tomamos como objetos de análise os compostos **1d**, **2b** e **3b**, que diferem estruturalmente nos núcleos heterocíclicos e se assemelham nos substituintes (todos possuem um grupo *p*-metil-fenila ligado ao anel heterocíclico, e os compostos **1d** e **2b** ainda apresentam uma metila também ligada ao anel). O composto pirazólico inibiu a enzima apenas de estriado, o composto isoxazolinônico inibiu em córtex e o composto isoxazólico inibiu indiscriminadamente as enzimas de ambas as estruturas. Mais uma vez, a presença ou não de inibição relaciona-se, possivelmente à seletividade que os compostos apresentaram pelas isoformas da enzima. Como pode ser visto o composto **2b** não mostrou seletividade a nenhuma delas.

Relacionando, desta vez, os compostos **2a** e **3a**, que diferem quanto à classe (substituintes de ambos são grupos fenila), observa-se certa preferência por isoformas diferentes da enzima já que um inibiu a AChE de estriado (**2a**) e o outro inibiu a de cortex (**3a**). Da mesma forma, os compostos **2c** e **3c** mostraram diferentes perfis de inibição: o composto **2c** não inibiu em nenhuma estrutura e o **3c** inibiu em córtex e estriado. A presença do grupamento *p*-metóxi-fenila nesses compostos, não interveio no modo como eles interagiram com a enzima, visto que um deles inibiu a enzima e o outro não, nesse caso, torna-se necessário comparar os compostos com relação às classes às quais pertencem.

Os compostos da classe dos isoxazóis mostraram certas particularidades no grau de inibição: da mesma forma que um composto dessa classe não inibiu a enzima em nenhuma estrutura (**2c**), outro inibiu em todas (**2d**), inclusive no hipocampo, sendo o único composto dos onze a inibir a enzima dessa estrutura cerebral. Comparando-se os compostos **2c** e **2d** percebe-se a presença de grupamentos que interagem de forma distinta com o anel aromático do substituinte (*p*-metóxi em **2c** é grupo ativador do anel, *p*-nitro em **2d** é desativador). Este fato poderia servir como critério para avaliar essa grande diferença entre o perfil inibitório de ambos. Estudos envolvendo compostos terpenóides e a AChE mostram que diferenças entre os substituintes de uma mesma classe de composto podem alterar

significativamente a eficiência inibitória dos mesmos (CHOUDHARY et al, 2006; SAUVAÎTRE et al, 2007).

Isto está de acordo com os resultados obtidos também para a última classe de heterociclos testada, as isoxazolinonas. Para estes compostos, apenas o **3a** não inibiu a enzima de estriado. Os outros dois compostos, **3b** e **3c**, inibiram a enzima nas duas estruturas cerebrais, mostrando que a presença de grupamentos ativadores do anel do substituinte, no caso dessa classe de compostos, pode ter conduzido a uma melhor interação da enzima com os inibidores. Grupamentos ditos ativadores do anel, contribuem para aumentar a reatividade do anel aromático fazendo com que ele, através das estruturas de ressonância formadas, possa interagir com grupamentos de compostos vizinhos, tais como resíduos de aminoácidos. Esta pode ser uma provável explicação para a inibição produzida por essa classe de heterociclos. Além disso, a presença de uma carbonila hidroliticamente lábil na estrutura química desses compostos pode ajudar a discriminar a inibição do composto **3c** do **2c**, uma vez que ambos possuem um grupamento fortemente ativador do anel, porém não foi observada inibição da enzima para o isoxazol.

De todos os compostos testados, apenas dois inibiram fortemente a enzima e esses dois compostos, **2a** e **3c**, foram escolhidos para a avaliação dos parâmetros cinéticos da AChE. Como foi visto, esses dois compostos exibiram tipos diferentes de inibição: o composto **2a** inibiu competitivamente a enzima de estriado e o composto **3c** apresentou inibição do tipo não-competitiva, em AChE de córtex. Embora esses dois compostos não tenham inibido a enzima igualmente em todas as estruturas cerebrais, é possível perceber que, quando comparados à forma purificada da enzima proveniente de *Electrophorus electricus*, eles apresentaram o mesmo tipo de inibição que apresentaram na respectiva estrutura cerebral: competitiva para o composto **2a** e não-competitiva para o composto **3c**. Considerando que a principal forma da EeAChE é a assimétrica ligada a colágeno, A12 (MASSOULIE et al, 1982) e que as principais isoformas de AChE de cérebros de ratos são as do tipo globular G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e G<sub>4</sub> (RIEGER & VIGNY, 1976), pode-se inferir que, obviamente houve uma seletividade dos compostos pelas diferentes formas globulares da enzima.

Mais estudos são necessários para avaliar quais destas formas foram inibidas e por quais compostos, entretanto, apenas por terem exibido tal seletividade, estes

compostos podem ser úteis na avaliação da inibição em diferentes isoformas desta importante enzima. Desse modo, pode-se concluir que a investigação de novos inibidores da AChE, bem como o estudo de suas interações com esta enzima necessitam de informações mais apuradas, como a identificação da isoforma específica presente nas diferentes estruturas cerebrais e pesquisas envolvendo modelagem molecular, para assim se ter uma maior clareza de como e onde o inibidor em questão estará agindo. Aliada a isto, a síntese direcionada de inibidores da enzima poderá se tornar uma importante ferramenta na descoberta de fármacos que poderão um dia ser utilizados no tratamento de patologias relacionadas ao sistema colinérgico.

## 5. CONCLUSÕES

- Observou-se efeito inibitório para a maioria dos compostos testados na atividade da enzima AChE de cérebros de ratos;
- Foi possível apresentar hipóteses que expliquem as diferenças dos graus de inibição nas diferentes estruturas cerebrais;
- O composto 3-metil-5-fenil-isoxazol, também citado como 2a, inibiu competitivamente a enzima de estriado e *EeAChE*, bem como o composto 3-(*p*-metóxi)-fenil-5-isoxazolinona, também citado como 3c, que inibiu de forma não-competitiva a enzima de córtex e *EeAChE*;
- Foi possível a análise cinética da inibição produzida por esses dois compostos tanto em AChE de cérebros de ratos quanto a proveniente de *Electrophorus electricus*;

- Possivelmente, a síntese de compostos análogos aos aqui apresentados seria promissora na avaliação da atividade da AChE e no estudo de prováveis inibidores desta enzima.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, R., HARTMAN, R.D., HAYES, P.E., GHARABAWI, M.. An overview of the development of SDZ ENA 713, a brain selective cholinesterase inhibitor. In: **Becker, R., Giacobini, E. \_Eds., Alzheimer's Disease: From Molecular Biology to Therapy**. Birkh"auser, Boston, pp. 239–243, 1996.

ANGLISTER, L.; STILES, J.R.; SALPETER, M.M. Acetylcholinesterase density and turnover number at frog neuromuscular junctions, with modeling of their role in synaptic function. **Neuron** v. 12, p. 783–794, 1994.

ANTUONO, P.G. (Mentane Study Group): Effectiveness and safety of velnacrine for the treatment of Alzheimer's disease: a double-blind, placebo-controlled study. **Arch Intern Med** v. 155, p. 1766–1772, 1995.

ASHANI, Y., PEGGINS, J.O., DOCTOR, B.P. Mechanism of inhibition of cholinesterase by huperzine A. **Biochem Biophys Res Commun** v. 184, p. 7719–7726, 1992.

B. M. MCGLEENON, K. B. DYNAN & A. P. PASSMORE. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, p. 471–480, 1999.

BARTOL, T.M. JrR.; LAND, B.R.; SALPETER, E.E.; SALPETER, M.M. Monte Carlo simulation of miniature endplate current generation in the vertebrate neuromuscular junction. **Biophysical Journal** v. 59, p.1290–1307, 1991.

BAUP, S. **Justus Liebigs Ann. Chem.** V. 81, p. 96, 1852.

GIANNI BENZI, G.; ANTONIO MORETTI, A. Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? **European Journal of Pharmacology** v. 346, p.1–13, 1998.

BON, C.L. & GREENFIELD, S.A. Bioactivity of a peptide derived from acetylcholinesterase: electrophysiological characterization in guinea-pig hippocampus. **European Journal of Neuroscience**. V. 17, p. 1991–1995, 2003.

BON, S.; AYON, A.; LEROY, J.; MASSOULIE, J. Trimerization domain of the collagen tail of acetylcholinesterase. **Neurochem. Res.** v. 28, p. 523–535, 2003.

BOWDEN, K.; DRYSDALE, A. C. **Tetrahedron Lett.** 727, 1965.

BOYNE, M.; STRATTON, C.; JOHNSON, F.; TONGE, P. **ACS Chem. Biol.** V. 1, p. 43, 2006.

BRENNER, G. M. **Pharmacology**. Philadelphia, 2000.

CASELLI, R.J., BEACH, T.G., YAARI, R., REIMAN, E.M. Alzheimer's disease a century later. **Journal of Clinical Psychiatry** v. 67, p. 1784–1800, 2006.

CERESOLE, M. **Ber.** V. 17, p. 812, 1884.



CHACON, M.A., REYES, A.E., INESTROSA, N.C. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 15, p. 87:91, 2003.

CHILTON, W. S.; OU, J. **Lloydia**. V. 39, p. 150, 1976.

CHOUDHARY MI, SHAHNAZ S, PARVEEN S, KHALID A, MESAİK AM, AYATOLLAHI SAM, RAHMAN A. New Cholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus hyrcana*. **Chem biodiversity**. V. 3, p. 1039-1052, 2006.

CLAISEN, L. Ber. V. 24, p. 3900, 1891.

CLAISEN, L.; LOWMAN, O. **Ber**. V. 21, p. 1149, 1888.

COLLIER, B. & KATZ, H.S. The synthesis, turnover and release of surplus acetylcholine in a sympathetic ganglion.. **Journal of Physiology** (Lond). V. 214, p. 537–552, 1971.

COMETA, M. F.; LORENZINIA, P.; FORTUNA, S.; VOLPEA, M. T.; MENEGUZA, A.; PALMERY, M. In vitro inhibitory effect of aflatoxin B1 on acetylcholinesterase activity in mouse brain. **Toxicology**. V. 206, p. 125–135, 2005.

COREY-BLOOM, J.; ANAND, R.; VEACH, J. (ENA 713 B352 Study Group): A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychopharmacology**. V. 1, p. 55–65, 1998.

COSTA, L. G. Current issues in organophosphate toxicology. **Clinica Chimica Acta** v. 366, p. 1-13, 2006.

COYLE, J., KERSHAW, P. Galantamine, a cholinesterase inhibitor that allosterically modulates nicotinic receptors: effects on the course of Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry** v. 49(3), p. 289–99, 2001.

CRISMON, M.L. Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease. **Ann Pharmacother**, v. 28, p. 744-751, 1994.

CUMMINGS, J. L. Metrifonate: overview of safety and efficacy. **Pharmacotherapy** v. 18(2 Pt 2), p. 43–46, 1998.

CUMMINGS, J.L.; CYRUS, P.A.; BIEBER, F.; MAS, J.; ORAZEM, J.; GULANSKI, B. (Metrifonate Study Group): Metrifonate treatment of the cognitive deficits of Alzheimer's disease. **Neurology**. V. 50, p.1214–1221, 1998.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**. V. 68, p. 1545–1555, 2001.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V.81, p.89–99, 2005.

DARVESH, S., HOPKINS, D.A., GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nat. Rev. Neurosci**. V. 4, p. 131–138, 2003.

DARY, O. & WEDDING, R.T. Absence of substrate inhibition and freezing-inactivation of the mosquito acetylcholinesterase are caused by alterations of hydrophobic interactions. **Biochim Biophys Acta** v. 1039, p. 103–109, 1990.

DAVIS, K. L.; MOHS, R. S. Enhancement of memory processes in Alzheimer's disease with multiple-dose intravenous physostigmine. **American Journal of Psychiatry**, v.139, p.1421-1424, 1982.

DAVIS, K. L.; POWCHICK, P. **Lancet**, v. 345, p. 625, 1995.

DAVIS, K.L.; THAL, L.J.; GAMZU, E.R.; DAVIS, C.S.; WOOLSON, R.F.; GRACON, S.I.; DRACHMAN, D.A.; SCHNEIDER, L.S.; WHITEHOUSE, P.J.; HOOVER, T.M.; MORRIS, J.C.; KAWAS, C.H.; KNOPMAN, D.S.; EARL, N.L.; KUMAR, V.; DOODY, R.S. (the Tacrine Collaborative Study Group): A doubleblind, placebo-controlled multicenter study of tacrine for Alzheimer's disease. **N Engl J Med**. V. 327, p.1253–1259, 1992.

DAY, T.; GREENFIELD, S. A. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones in vitro: molecular mechanisms. **Neuroscience**, v. 111, p. 649-656, 2002.

DEL CASTILLO, J., DE MELLO, W.C., and MORALES, T. The initiation of action potentials in the somatic musculature of *Ascaris lumbricoides*. **Journal of Experimental Biology**. V. 46, p. 263–279, 1967.

DEL CASTILLO, J., DE MELLO, W.C., and MORALES, T. The physiological role of acetylcholine in the neuromuscular system of *Ascaris lumbricoides*. **Arch. Int. Physiol. Biochim**. V. 71, p. 741–757, 1963.

DÖPP, K. D.; MAURER, S.; SASAKI, A. N.; MUSSO, H. **Justus Liebig's Ann. Chem**. 254, 1982.

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERY, T.L.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**. V.187, p.10–22, 2010.

EDDLESTON, M.; JUSZCZAK, E.; BUCKLEY, N.A.; SENARATHNA, L.; MOHAMED, F.; DISSANAYAKE, W.; HITTARAGE, A.; AZHER, S.; JEGANATHAN, K.; JAYAMANNE, S.; SHERIFF, M.H.R.; WARRELL, D.A. Multiple-dose activated charcoal in acute self-poisoning: a randomised controlled trial. **Lancet**. v. 371, p. 579–587, 2008.

ENZ A, AMSTUTZ R, BODDEKE H, GMELIN G, MALANOWSKI J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. **Prog. Brain Res**. v.98, p.431–438, 1993.

ENZ, A., BODDEKE, H., GRAY, J., AND SPIEGEL, R. **Ann. N.Y. Acad. Sci**. v. 640, p. 272-275, 1991.

EUGSTER, C. H. **Fortsc. Chem. Org. Naturstoffe**. V. 27, p. 261, 1969.

EUGSTER, C. H.; MÜLLER, G. F. R.; GOOD, R. **Tetrahedron Lett**. 1813, 1965.

FANCELLI, D.; MOLL, J.; VARASI, M.; BRAVO, R.; ARTICO, R.; BERTA, D.; BINDI, S.; CAMERON, A.; CANDIANI, I.; CAPPELLA, P.; CARPINELLI, P.; CROCI, W.; FORTE, B.; GIORGINI, M. L.; KLAPWIJK, J.; MARSIGLIO, A.; PESENTI, E.; ROCCHETTI, M.; ROLETTO, F.; SEVERINO, D.; SONCINI, C.; STORICI, P.; TONANI, R.; ZUGNONI, P.; VIANELLO, P. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 49, p. 7247, 2006.

FARLOW, M.; GRACON, S.I.; HERSHEY, L.A.; LEWIS, K.W.; SADOWSKY, C.H.; DOLAN-URENO, J. (Tacrine Study Group): A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. **JAMA**. V. 268, p. 2523–2529, 1992.

FELDER, C.E.; BOTTISA, LIFSON, S., SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. External and internal electrostatic potentials of cholinesterase models. **Journal of Molecular Graphical Model** v. 15, p. 318–327, 335–337, 1997.

FRAHM, W.; HAGER, H. H. JBRUCHHAUSEN, F. V.; M. ALBINUS, M.; H. HAGER, *Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Folgebände 4: Stoffe A-K*, Birkhäuser, 1999.

FREEMAN, S.E., DAWSON, R.M. Tacrine: a pharmacological review. **Prog. Neurobiol**. V. 36, p. 257–277, 1991.

- FUSCO, R.; ZUMIN, S. Gazz. **Chim. Ital.** V. 76, p. 223, 1946.
- GALLO, M.A. & LAWRYK, N.J. Organic phosphorus pesticides. In: **Hayes Jr ER, Laws ER, editors. Handbook of Pesticide Toxicology Classes of Pesticides**, vol. 2. San Diego' Academic Press; 1991. p. 917– 1123.
- GEIB, S.J., TUCKMANTEL, W., KOZIKOWSKI, A.P.. Huperzine A—a potent acetylcholinesterase inhibitor of use in the treatment of Alzheimer's disease. **Acta Crystallogrica** v. 47, p. 824– 827, 1991.
- GELDMACHER, D.S., FROLICH, L., DOODY, R.S., ERKINJUNTTI, T., VELLAS, B., JONES, R.W., BANERJEE, S., LIN, P., SANO, M. Realistic expectations for treatment success in Alzheimer's disease. **J Nutr Health Aging**, v. 10, p. 417-429, 2006.
- GIACOBINI, E. Invited Review Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications. **Neurochemistry Internacional**, v. 32 p. 413-419, 1998.
- GILSON, M.K.; STRAATSMA, T.P.; MCCAMMON, J.A.; RIPOLL, D.R.; FAERMAN, C.H.; AXELSEN, P.H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. **Science** v. 263, p. 1276–1278, 1994.
- GREIG, N.H., DE MICHELI, E., HOLLOWAY, H.W., YU, Q.S., UTSUKI, T., PERRY, T.A. The experimental Alzheimer drug phenserine: preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Acta Neurol Scand Suppl** v. 176, p. 74–84, 2000.
- GREIG, N.H., PEI, X.F., SONCRANT, T.T., INGRAM, D.K., BROSSI, A. Phenserine and ring C hetero-analogues: drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. **Med Res Rev** v. 15(1), p.3–31, 1995.
- GRISARU, D.; LEV-LEHMAN, E.; SHAPIRA, M.; CHAIKIN, E.; LESSING, J.B.; ELDOR, A.; ECKSTEIN, F.; SOREQ, H. Human osteogenesis involves differentiation-dependent increases in the morphogenically active 3' alternative splicing variant of acetylcholinesterase. **Molecular and Cellular Biology**. V. 19, p. 788–795, 1999.
- GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 672-686, 1999.
- HANIN, I., TANG, X.C., KINDEL, G.L., KOZIKOWSKI, A.P. Natural and synthetic huperzine A: effect on cholinergic function in vitro and in vivo. **Ann N Y Acad Sci** v. 695, p. 304– 306, 1993.
- HANTSCH, A. **Justus Liebigs Ann. Chem.** V. 249, p. 1, 1888.
- HARELI, M., SUSSMAN, J.L., KREJCI, E., BON, S., CHANAL, P., MASSOULIE, J. AND SILMAN, I. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 89, p. 10827-10831, 1992.
- HARRELL, L.E., CALLOWAY, R., MORERE, D, FALGOUT, J.: The effect of long-term physostigmine administration in Alzheimer's disease. **Neurology** v. 40, p. 1350–1354, 1990.
- HERRMANN, M.; EHRLER, J.; KAYSER, H.; RINDLISBACHER, A.; HOFLE, G. Chemical modification of thiagazole A in the oxazole and styryl region. **European. Journal. Of Organic. Chemistry** p. 3381–3392, 1999.
- HINZ, V.C.; GREWING, S.; SCMITDT, B.H. Metrifonate induces cholinesterase inhibition exclusively via slow release of dichlorvos. **Neurochem Res** v. 21, p. 331–337, 1996.
- I. I. GRANDBERG AND A. N. KOST, *Dokl. Akad. Nauk.* **Proc. Acad. Sci. USSR**, v. 141, p. 1251 1961.

IMBIMBO, B.P.; LUCCA, U.; LUCHELLI, F.; ALBERONI, M.; THAL, L.J. (Eptastigmine Study Group): A 25-week placebo-controlled study of eptastigmine in patients with Alzheimer's disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**. V. 12, p. 313–322, 1998.

JANN, M.W. Preclinical pharmacology of metrifonate. **Pharmacotherapy** v. 18(2 Pt 2), p. 55–67, 1998.

JEFFREY, L. & CUMMINGS, M.D. Cholinesterase Inhibitors: A New Class of Psychotropic Compounds. **American Journal of Psychiatry** v.157 p.4–15, 2000.

JOKANOVIĆ, M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. **Toxicology Letters**. V. 109, p. 107-115. 2009.

KAUFER, D.; FRIEDMAN, A.; SEIDMAN, S.; SOREQ, H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. **Nature** v. 393, p. 373–377, 1998.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & therapeutics**, v. 86, p. 29-48, 2000.

KIM, H.; HO, C. T.; CHANG, S. S. J. **Am. Oil Chem. Soc.** V. 61, p. 1235, 1984.

KITZ, R.J.; BRASWELL, L.M.; GINSBURG, S. On the question: is acetylcholinesterase an allosteric protein? **Molecular Pharmacology**. V. 6, p. 108–121, 1970.

KLAFKI, H.W.; STAUFENBIEL, M.; KORNHUBER, J.; WILTFANG, J: Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. **Brain** v. 129, p. 2840-2855, 2006.

KNAPP, M.J.; KNOPMAN, D.S.; SOLOMON, P.R.; PENDLEBURY, W.W.; DAVIS, C.S.; GRACON, S.I. (Tacrine Study Group): A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. **JAMA**. V. 271, p. 985–994, 1994.

KRUPKA, R.M. The mechanism of action of acetylcholinesterase: substrate inhibition and the binding of inhibitors. **Biochemistry** v. 2, p. 76–82, 1963.

KUHR, R. J. & DOROUGH, H. W. Carbamate insecticide: Chemistry, biochemistry and toxicology. 1976 a. **CRC Press**, Cleveland, OH, p. 41-70.

KUSUMI, T.; CHANG, C. C.; WHEELER, M.; KUBO, I.; NAKANISHI, K.; NAOKI, H. **Tetrahedron Lett**. V. 22, p. 3451, 1981.

LI, Y.; CAMP, S.; RACHINSKY, T.L.; GETMAN, D.; TAYLOR, P. Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. **Journal of Biological Chemistry**. v. 266, p. 23083–23090, 1991.

LILIENFELD, S. Galantamine—a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. **CNS Drug Rev** v. 8(2), p. 159–76, 2002.

LOEWI, O. Über humerole übertragbarkeit der herznervenwirkung. **I. Mitteilung. Pflugers Arch**. V. 189, p. 239–242, 1921.

LOTTI, M. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: **Krieger RI, editor. Handbook of Pesticide Toxicology**. San Diego' Academic Press; 2001. p. 1043–85.

LOTTI, M. Organophosphorous compounds. In: **Spencer PS, Schaumburg HH, Ludolph AC, editors. Experimental and Clinical Neurotoxicology**. Oxford' Oxford University Press; 2000. p. 898–925.

MARTIN, L. L.; DAVIS, L.; KLEIN, J. T.; NEMOTO, P.; OLSEN, G. E.; BORES, G. M.; CAMACHO, F.; PETKO, W.; RUSH, D. K.; SELK, D.; SMITH, C. P.; VARGAS, H. M.; EFFLAND, R.; FINK, D. Bioorganic **Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, p. 157, 1997.

MASSOULIE, J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. **Neurosignals** v. 11, p. 130–143, 2002.

MASSOULIE, J.; ANSELMET, A.; BON, S.; KREJCI, E.; LEGAY, C.; MOREL, N.; SIMON, S. The polymorphism of acetylcholinesterase: posttranslational processing, quaternary associations and localization. **Chemical and Biological Interactions**. V. 119–120, p. 29–42, 1999.

MASSOULIE, J. and BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annual Reviews in Neuroscience**. V. 5, p. 57-106, 1982.

MCNALLY W, ROTH M, YOUNG R. Quantitative whole-body autoradiographic determination of tacrine tissue distribution in rats following intravenous or oral dose. **Pharmacology Research** v. 6, p.: 924–930, 1989.

MELLANBY, H. The identification and estimation of acetylcholine in three parasitic nematodes (*Ascaris lumbricoides*, *Litomosoides carinii*, and the microfilariae of *Dirofilaria repens*). **Parasitology** v. 45, p. 287–294, 4.1955

MESHORER E, SOREQ H (2006) Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci* (in press)

MESHORER, E., TOIBER, D., ZUREL, D., SAHLY, I., DORI, A., CAGNANO, E., SCHREIBER, L., GRISARU, D., TRONCHE, F., SOREQ, H. Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products. *Journal of Biological Chemistry*. V. 279, p. 29740–29751, 2004.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience** v. 110, p. 627-639, 2002.

MIMORI, Y.; NAKAMURA, S.; YUKAWA, M. Abnormalities of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease with special reference to effect of acetylcholinesterase inhibitor. **Behavioural Brain Research**. V. 83, p. 25-30, 1997.

MOLCHAN S.E.; VITIELLO B.; MINICHIELLO M, SUNDERLAND T: Reciprocal changes in psychosis and mood after physostigmine in a patient with Alzheimer's disease (letter). **Arch Gen Psychiatry** v. 1991; 48, p. :1113, 1991.

MORRIS, J.C.; CYRUS, P.A.; ORAZEM, J.; MAS, J.; BIEBER, F.; RUZICKA, B.B.; GULANSKI, B. Metrifonate benefits cognitive, behavioral, and global function in patients with Alzheimer's disease. **Neurology** v. 50, p. 1222–1230, 1998.

MUSTAZZA, C.; BORIONI, A.; GIUDICE, M. R.; GATTA, F.; FERRETTI, R.; MENEGUZ, A.; VOLPE, M. T.; LORENZINI, P. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 91, 2002.

NEWELL, M. P.; HECKMAN, R. A.; MOATES, R. F.; GREEN, C. R.; BEST, F. W.; SCHUMACHER, J.N. **Tob. Sci.** V. 22, p. 6, 1978.

OBREGON, A. D. C. **3-Alcói-4-Hidroxi Pirrolidin-2-onas, 2-Metilsulfanil Pirimidina, Enoilcarbamatos e 3-dialcóxifosforiloxitriometilados: síntese e Potencial inibitório sobre a Enzima Acetilcolinesterase**. 2006. Tese (Doutorado em Química Orgânica) — Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

OGANE, N.; GIACOBI, E.; MESSAMORE, E. **Journal of Neurochemistry**, v. 47, p. 489, 1992.

ONDA, M.; FUKUSHIMA, H.; AKAGAWA, M. **Chem. Pharm. Bull.** V. 12, p. 751, 1964.

ORDENTLICH, A., BARAK, D., KRONMAN, C., FLASHNER, Y., LEITNER, M., SEGALL, Y., ARIEL, N., COHEN, S., VELAN, B. AND SHAFFERMAN, A. **Journal of Biological Chemistry**. V. 268, p. 17083-17095, 1993.

OUYANG, G.; CHEN, Z.; CAI, X. J.; SONG, B. A.; BHADURY, P. S.; YANG, S.; JIN, L. H.; XUE, W.; HU, D. Y.; ZENG, S. Synthesis and antiviral activity of novel pyrazole derivatives containing oxime esters group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 16, p. 9699–9707, 2008.

P. BAR-ON; C. B. MILLARD; M. HAREL; H. DVIR; A. ENZ; J. L. SUSSMAN; I. SILMAN. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. **Biochemistry** v. 41, p. 3555-3564, 2002.

PERRIER, A.L.; MASSOULIE, J.; KREJCI, E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. **Neuron** v. 33, p. 275–285, 2002.

PEVARELLO, P.; BRASCA, M. G.; AMICI, R.; ORSINI, P.; TRAQUANDI, G.; CORTI, L.; PIUTTI, C.; SANSONNA, P.; VILLA, M.; PIERCE, B. S.; PULICI, M.; GIORDANO, P.; MARTINA, K.; FRITZEN, E. L.; NUGENT, R. A.; CASALE, E.; CAMERON, A.; CIOMEI, M.; ROLETTO, F.; ISACCHI, A.; FOGLIATTO, G.; PESENTI, E.; PASTORI, W.; MARSIGLIO, A.; LEACH, K. L.; CLARE, P. M.; FIORENTINI, F.; VARASI, M.; VULPETTI, A.; WARPEHOSKI, M. A. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 47, p. 3367, 2004.

PIETRA, C., VILLETTI, G., BOLZONI, P.T, DELCANALE, M., AMARI, G., CARUSO, P. , ET AL. Cholinesterase inhibitory activity of new geneserine derivatives. In: **Iqbal K, Swaab DF, Winblad D, Wisniewski HM, editors. Alzheimer's disease and related disorders**. New York: John Wiley & Sons; 1999. p. 689–96.

PINHO E MELO, T. M. V. D. Recent advances on the synthesis and reactivity of isoxazoles. **Current Organic Chemistry**. V. 9, p. 925–958, 2005.

POLINSKI, R. *Journal of Clinical Therapy*, v. 20, p. 634, 1998.

POTKIN, V. I.; PETKEVICH, S. K.; ZALESSKAYA, E. G. Synthesis of Functionally Substituted Isoxazoles from 5-(2,5-Dimethylphenyl)-1,2-oxazole-3-carbonitrile. **Russian Journal of Organic Chemistry** V. 45 No. 6, p. 879-883, 2009.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, F. V.; MELLO, M. C. GOMEZ, M. V.; MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry Internacional**, v. 41, p. 291-299, 2002.

QUESNELLE, C. A.; GILL, P.; ROY, S.; DODIER, M.; MARINIER, A.; MARTEL, A.; SNYDER, L. B.; D'ANDREA, V. S.; BRONSON, J.J.; FROSCO, M. B.; BEAULIEU, D.; WARR, G.A.; DENBLEYKER, K.L.; STICKLE, T.M.; YANG, H.; CHANIEWSKI, S.E.; FERRARO, C.A.; TAYLOR, D.; RUSSELL, J.W.; SANTONE, K.S.; CLARKE, J.; DRAIN, R.L.; KNIPE, J.O.; MOSUREB, K.; BARRETT, J.F.. Biaryl isoxazolinone antibacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 15, p. 2728–2733, 2005.

QUILICO, A.; FUSCO, R.; ROSNATI, V. *Gazz. Chim. Ital.* V. 76, p. 30, 1946.

RACCHI, M.; MAZZUCHELLI, M.; PORRELLO, E.; LANNI, C.; GOVONI, S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. **Pharmacological Research** v. 50, p. 441–451, 2004.

RAINER, M. Galantamine in Alzheimer's disease: a new alternative to tacrine? **CNS Drugs** V. 2, p. 89–97, 1997.

RAND, J. B. Acetylcholine. **Wormbook**, Ed. The *C. elegans* Research Community, 2007.

RAVES, M.L., HAREL, M., PANG, Y.P., SILMAN, I., KOZIKOWSKI, A.P., SUSSMAN, J.L.. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. **Nat Struct Biol** v. 1, p. 57–63, 1997.



RIEGER, P., VIGNY, M. Solubilization and physicochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase: Development and maturation of its molecular forms. **Journal of Neurochemistry**. V. 27, p. 121-129, 1976.

RIPOLL, D.R., FAERMAN, C.H., AXELSEN, P.H., SILMAN, I. AND SUSSMAN, J.L. **Natl. Acad. Sci. USA** v. 90, p. 5128-5132, 1993.

ROGERS, S.L.; FARLOW, M.R.; DOODY, R.S.; MOHS, R.; FRIEDHOFF, L.T. (Donepezil Study Group): A 24-week, double-blind, placebocontrolled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. **Neurology**. v. 50, p. 136–145, 1998.

ROGERS, S.L.; YAMANISHI, Y. ; YAMATSU, K. ; BECKER, R. ; GIACOBINI, E, eds. *Cholinergic Basis for Alzheimer Therapy*. 3rd ed. Boston: Birkhäuser 1991 E2020—The pharmacology of a piperidine cholinesterase inhibitor. p. 314–320.

ROSENBERRY, T.L. Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 72, p. 3834–3838, 1975.

SAMOCHOCKI, M., HÖFFLE, A., FEHRENBACHER, A., JOSTOCK, R., LUDWIG, J., CHRISTNER, C., RADINA, M., ZERLIN, M., ULLMER, C., PEREIRA, E.F., LUBBERT, H., ALBUQUERQUE, W.X., MAELICKE, A. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not muscarinic acetylcholine receptors. **Journal of Pharmacologic Experimental Therapy**, v. 305, p. 10254-1036, 2003.

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature reviews**, v. 6, p. 48-56, 2005.

SAUVAÎTRE, T.; BARLIER, M.; HERLEM, D.; GRESH, N.; CHIARONI, A.; GUENARD, D.; GUILLOU, C. New potent acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene series. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 50, p. 5311-5323, 2007.

SAXENA, A., QUAN, N., KOVACH, I.M., KOZIKOWSKI, A.P., PANG, Y.P., VELLOM, D.C. , Identification of amino acid residues involved in the binding of huperzine A to cholinesterase. **Protein Science** v. 3, p. 1770– 1778, 1994.

SCHRATTENHOLZ, A.; PEREIRA, E.F.; ROTH, U.; WEBER, K.H.; ALBUQUERQUE, E.X.; MAELICKE, A. Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. **Molecular Pharmacology** v. 49(1), p. 1–6, 1996.

SCHWARTZ, A.S., KOHLSTAEDT, E.V. Physostigmine effects in Alzheimer's disease: relationship to dementia severity. **Life Sci Science** v. 38, p. 1021–1028, 1986.

SELEN, A.;BALOGH, L.; SIEDLIK, P. Pharmacokinetics of tacrine in healthy subjects. **Pharmacology Research** v. 5, p. S218, 1988.

SHAFFERMAN, A; VELAN, B; ORDENTLICH, A; KRONMAN, C; GROSFELD, H; LEITNER, M; FLASHNER, Y; COHEN, S; BARAK D; ARIEL, N. Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center. **EMBO J** v. 11, p. 3561–3568, 1992.

SHAFFERMAN, A.; ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; KRONMAN, C.; BER, R.; BINO, T.; ARIEL, N.; OSMAN, R.; VELAN, B. Electrostatic attraction by surface charge does not contribute to the catalytic efficiency of acetylcholinesterase. **EMBO J**. v. 13, p. 3448–3455, 1994.

SNYDER, L.B.; MENG, Z.; MATE, R.; D'ANDREA, S.V.; MARINIER, A.; QUESNELLE, C.A.; GILL, P.; DENBLEYKER, K.L.; FUNG-TOMC, J.C.; FROSCO, M.B.; MARTEL, A.; BARRETTA, J.F.; BRONSONA, J.J. Discovery of isoxazolinone antibacterial agents. Nitrogen as a replacement for the stereogenic center found in oxazolidinone antibacterials. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 14, p. 4735–4739, 2004.

SOREQ, H., GNATT, A., LOEWENSTEIN, Y. AND NEVILLE, L.F. **Trends Biochem. Sci.** V. 17, p. 353-358, 1992.

SOREQ, H.; BEN-AZIZ, R.; PRODY, C.A.; SEIDMAN, S.; GNATT, A.; NEVILLE, L.; LIEMAN-HURWITZ, J.; LEV-LEHMAN, E.; GINZBERG, D.; LIPIDOT- LIFSON, Y. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+C-rich attenuating structure. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 87, p. 9688–9692, 1990.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SRAMEK, J.J.; ANAND, R.; WARDLE, T.S.; IRWIN, P.; HARTMAN, R.D.; CUTLER, N.R. Safety/tolerability trial of SDZ ENA 713 in patients with probable Alzheimer's disease. **Life Science**. V. 58, p.1201–1207, 1996.

SUGIMOTO H, IIMURA Y, YAMANISHI Y, YAMATSU K. Synthesis and anti-acetylcholinesterase activity of 1-benzyl-4-[5, 6-dimethoxy-1-indanon-2-yl] methylpiperidine hydrochloride (E2020) and related compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** v. 2, p.: 871–876, 1992.

SUGIMOTO, H.; OGURA, H.; ARAI, Y.; IIMURA, Y.; YAMANISHI, Y. Research and Development of Donepezil Hydrochloride, a New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor. **Journal of Pharmacology** v. 89, p. 7 – 20, 2002.

SUSSMAN, J.L., HAREL, M. AND SILMAN, I. in *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Function* (Shaffermann, A. and Velan, B., eds.), pp. 95-108, Plenum Press, New York. 1992.

SUSSMAN, J.L., HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L. AND SILMAN, I. **Science** v. 253, p. 872-879, 1991.

SUSSMAN, J.L., HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L., SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**. v. 253, p. 872–879, 1991.

SZEGLETES, T., MALLENDER, W.D., THOMAS, P.J., ROSENBERRY, T.L. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. **Biochemistry** v. 38, p. 122-133, 1999.

TAKEMOTO, T.; YOKOBE, T.; NAKAJIMA, T. *Yakugaku Zasshi*. V. 84, p. 1186, 1964.

TARIOT, P. Current status and new developments with galantamine in the treatment of Alzheimer's disease. **Expert Opin Pharmacother** v. 2(12), p. 2027–49, 2001.

TARIOT, P.N. Evaluating response to metrifonate. **Journal of Clinical Psychiatry** v. 59(9), p. 33–7, 1998.

TARIOT, P.N.; SCHNEIDER, L. Contemporary treatment approaches to Alzheimer's disease. **Consultant Pharmacist** v. 11(suppl E), p. 16–24, 1996.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: **Hardman JG, Limbird LE, editors. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th edition. New York' McGraw-Hill; 1996. p. 161– 76.

TAYLOR, P. Development of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease. **Neurology** v. 51(suppl 1), p. S30–S35, 1998.

THAL, L.; FULD, P. A.; MASUR, D. M.; SHARPLESS, N. S. Oral physostigmine and lecithin improve memory in Alzheimer disease. **Annual Neurology**, v.13, p. 1241-1245, 1983.



THAL, L.J.; FERGUSON, J.M.; MINTZER, J.; RASKIN, A.; TARGUM, S.D. A 24- week randomized trial of controlled-release physostigmine in patients with Alzheimer's disease. **Neurology**. V. 52, p. 1146–1152, 1999.

TRABACE, L., CASSANO, T., LOVERRE, A., STEARDO, L., CUOMO, V. CHF2819: pharmacological profile of a novel acetylcholinesterase inhibitor. **CNS Drug Rev** v. 8(1), p. 53–69, 2002.

TROFIMENKO, S. The Coordination Chemistry of Pyrazole-derived Ligands. **Chemical Reviews**, Vol. 72, No. 5, p 497-509, 1972.

VED, H.S., KOENIG, M.L., DAVE, J.R., DOCTOR, B.P. Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. **Neuroreport** v.8, p. 963 –968, 1997.

VELLOM, D.C., RADIC, Z., LI, Y., PICKERING, N.A., CAMP, S. AND TAYLOR, P. **Biochemistry** v. 32, p. 12-17, 1993.

VICENTINI, C. B.; GUCCIONE, S.; GIURATO, L.; CIACCIO, R.; MARES, D.; FORLANI, G. **Journal of Agriculture and Food. Chemistry**. V. 53, p. 3848, 2005.

WOBLEN, H. J.; DE VALOIS, J.; TER HEIDE, R.; BOELEN, H.; TIMMER, R. **Proc. IV Int. Congree Food Sci. And Technol.** V. 1, p. 22, 1974.

ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 75, p. 675–686, 2003.

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of PF synaptic transmission. **Cell Tissue Research**, v. 326, p. 655-669, 2006.