



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE
DERIVADOS DE QUINOLINA NA HIPERFOSFORILAÇÃO DE
PROTEÍNAS TAU NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Alina Secrieru

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências

Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos

Cristiano e co-orientação da Professora Doutora Inês Maria Pombinho de Araújo

2017



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE
DERIVADOS DE QUINOLINA NA HIPERFOSFORILAÇÃO DE
PROTEÍNAS TAU NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Alina Secrieru

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos
Cristiano e co-orientação da Professora Doutora Inês Maria Pombinho de Araújo

2017

Síntese e avaliação *in vitro* da atividade de derivados de quinolina na hiperfosforilação de proteínas tau na Doença de Alzheimer

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 25 de setembro de 2017

Alina Secrieru

© 2017 Alina Secrieru

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero expressar a enorme gratidão que sinto perante a professora Maria de Lurdes Cristiano pela aceitação do meu pedido de orientação na realização deste trabalho. Obrigada por todo o carinho e dedicação, pelo apoio e pelo voto de confiança depositado em mim, sei que nada teria sido possível sem a excelente orientação da professora ao longo deste percurso. Apesar da sua longa lista de tarefas e de alunos para orientar, esteve sempre presente para responder às minhas dúvidas e necessidades da forma mais célere e para me motivar a acreditar nas minhas capacidades. Agradeço, ainda, a oportunidade de colaborar neste e noutros projetos e o estímulo para continuar a colaborar e a investir naquilo que se tornou um sonho, a ciência. Por tudo isto, muito obrigada!

Devo ainda agradecer à minha co-orientadora, à professora Inês Araújo, cujo contributo foi igualmente essencial na concretização do trabalho proposto para esta dissertação. Graças à sua orientação, tive a oportunidade de desenvolver um tema que sempre ambicionei explorar, e de reconhecer a paixão que tenho pelas neurociências. Muito obrigada!

A ambas as professoras agradeço ainda a oportunidade de realizar a componente prática, com todos os custos e despesas envolvidas. Cresci imenso e desenvolvi competências que nunca esperaria desenvolver num período de tempo tão curto e que certamente me serão úteis ao longo de toda a minha vida. Por essa razão, quero manifestar a minha gratidão e valorização de todo esforço realizado para garantir a concretização desta etapa.

Aos meus colegas de laboratório: o Pedro, que tem sido incansável e que, apesar de todo o trabalho, esteve sempre presente para me ajudar; à Sónia, à Sofia e à Ana Mestre, que dispenderam do seu tempo laboral para me acompanharem e transmitirem os seus conhecimentos. Sem vocês, não teria sido capaz de concretizar o trabalho experimental proposto e, por isso, muito obrigada, colegas!

À minha família, em especial à minha mãe e ao meu pai, pelo esforço e voto de confiança que depositaram em mim e que me permitiu concluir esta etapa com sucesso. Sei que não foi fácil suportar as despesas associadas aos meus estudos, mas sei também que, graças a este esforço, concluo este curso com sucesso e deixo-vos orgulhosos.

Agradeço às minhas amigas “Verdadeiras”, pelos convívios e presença ao longo destes cinco anos de curso. Em especial, agradeço à Ana Sofia Bota e à Cláudia Reis cuja companhia foi imprescindível e que me ajudaram a ultrapassar todas as barreiras que se foram atravessando no meu caminho. Agradeço as aventuras, todos os momentos partilhados e o estímulo que me deram para acreditar em mim e lutar pelos meus sonhos. O vosso contributo foi essencial para a conclusão desta etapa e fico eternamente grata por terem feito parte dela. Muito obrigada!

E, por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação e fizeram parte deste trajeto. A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa crônica caracterizada pela perda progressiva de memória e da cognição, e pelo aparecimento de distúrbios comportamentais e funcionais, culminando num comprometimento geral da realização de atividades diárias.

Os principais traços caracterizadores desta doença são as placas senis resultantes da deposição extracelular de proteína beta-amiloide ($A\beta$) e as tranças neurofibrilares intracelulares resultantes de emparelhamentos entre proteínas tau (τ) hiperfosforiladas.

A cinase dependente de ciclina 5, CDK5, está referenciada como uma das principais cinases envolvidas no processo de hiperfosforilação das proteínas tau e encontra-se hiperativa quando complexada com uma proteína truncada p25, em condições de neurodegenerescência. A inibição deste complexo representa uma possível abordagem para impedir a hiperfosforilação da tau.

Atualmente não existe cura para a doença de Alzheimer. As terapêuticas atuais atuam meramente ao nível sintomático, não promovendo alterações significativas na progressão da doença. É, portanto, crucial o desenvolvimento de investigação que possibilite um maior conhecimento dos mecanismos da doença, por forma a identificar alvos terapêuticos que consubstanciem o desenvolvimento racional de moléculas que possam representar soluções farmacológicas para a doença de Alzheimer.

As quinolinas são um grupo de compostos orgânicos caracterizados por um duplo anel resultante da fusão entre um benzeno e uma piridina, por intermédio de dois átomos de carbono adjacentes. A versatilidade do quimiótipo quinolínico tem estimulado um interesse particular nesta classe ao longo de muitas décadas, citando-se o exemplo da sua aplicação em medicina, como antibióticos e antimaláricos, entre outras aplicações terapêuticas, estando também em avaliação a sua aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas, nomeadamente na doença de Alzheimer.

Neste sentido, a presente monografia apresenta uma revisão bibliográfica relativa aos fundamentos teóricos associados à doença de Alzheimer, debruçando-se sobre os processos que envolvem as proteínas tau e o complexo CDK5-p25, sendo este escrutinado como alvo terapêutico a considerar na concepção e síntese de compostos

baseados numa estrutura química contendo um núcleo quinolínico enquanto candidatos promissores a fármacos modificadores da doença.

Para além da síntese de derivados quinolínicos com atividade para o complexo CDK5-p25, é apresentado, neste âmbito, um estudo da atividade de fármacos antimaláricos derivados do quinino a nível do alvo terapêutico supramencionado, uma vez que constituem fármacos cuja estrutura se baseia igualmente num núcleo quinolínico e cujo perfil de metabolização e segurança já se encontra estabelecido.

Este estudo permitiu identificar um via de síntese de quinolinas eficiente, incorporando técnicas mais recentes, e comprovar a possibilidade de indução de neurotoxicidade utilizando glutamato, para posterior avaliação da capacidade inibitória dos derivados de quinolina sintéticos farmacologicamente interessantes, no alvo selecionado.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, tau, hiperfosforilação, CDK5-p25, quinolinas, antimaláricos

ABSTRACT

Alzheimer's Disease is a chronic neurodegenerative disorder characterized by progressive memory loss, cognitive impairment and behavioral disturbances, which compromise on a long term the patients' routine and ability to perform the normal activities of daily living. It's a genetically complex, slowly progressive and irreversible disease, representing the most common neurodegenerative disorder in elderly population.

There are two neuropathological hallmarks of the disease: senile plaques, caused by the deposition of extracellular amyloid- β protein, and intracellular neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein.

Cyclin-dependent kinase 5 is a major tau kinase that is involved in abnormal phosphorylation in Alzheimer's Disease brains. This protein becomes hyperactive when complexed with a truncated form of its activator p35, p25, under neurotoxic conditions, and leads to tau pathology.

Currently, there are no effective treatments that reverse or substantially delay the progression of the disease, the existing treatment strategies acting mainly on symptomatic relief. For that reason, it's essential to invest in research towards a better understanding of disease mechanisms, in order to find efficient chemotherapeutic options to reverse disease pathology.

Quinolines are a group of compounds based on a bicyclic aromatic fused six-membered heterocyclic nucleus containing one to four nitrogen atoms, with one nitrogen atom on position 1 of the ring. The versatility of the quinoline chemotype associated to the potential of quinolines for applications in major fields, namely in medicine, for example, with the development of quinoline antimalarials and antibiotics, stimulated a perennial interest in this class for several decades. Nowadays this scaffolds is still being extensively explored for its excellent potential, including in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease.

This thesis presents a bibliographic review on the available knowledge regarding the characteristics and mechanisms of the Alzheimer's Disease, with an emphasis on tau pathology and the CDK5-p25 complex as a therapeutic target model which inspired the

synthesis of quinoline core-based chemical compounds as promising disease modifying drug candidates.

In addition to the synthesis of new quinoline derivatives, this thesis presents a study of the activity of some quinoline-type antimalarials on the CDK5-p25 complex, since the metabolic and safety profiles of these drugs have been established prior to their approval for use against malaria.

From this study it was possible to identify an efficient synthesis pathway, using novel and alternative methods, as well as the ability to induce neurotoxicity using glutamate, in order to analyse, in a posterior study, the inhibitory capacity of some interesting synthetic quinoline derivatives, from a pharmacological point of view.

Keywords: *Alzheimer's Disease, tau, hiperfosforilation, CDK5-p25, quinolines, antimalarial drugs*

ÍNDICE REMISSIVO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Alzheimer	1
1.2. História	1
1.3. Epidemiologia	2
1.4. Fisiopatologia da DA	3
1.4.1. A proteína beta-amiloide e as placas senis	4
1.4.2. A proteína tau e as tranças neurofibrilares	6
1.4.3. Glutamato, recetor NMDA e excitotoxicidade	7
1.5. Tipos de DA	9
1.6. Terapêutica	9
1.6.1. Inibidores da acetilcolinesterase	10
1.6.2. Antagonistas dos recetores NMDA	12
1.7. Fatores de risco	13
II. NOVOS ALVOS	16
2.1. A proteína tau	16
2.2. Tauopatias	17
2.2.1. Hiperfosforilação da tau	18
2.2.1.1. Proteína CDK5	19
2.2.1.2. P25	21
2.2.1.3. CDK5-p25 e a Doença de Alzheimer	22
2.3. Âmbito do trabalho	23
III. QUINOLINAS	27
3.1. Fundamento teórico	27
3.1.1. Quinolinas na Doença de Alzheimer	30
3.1.1.1. Antimaláricos com estrutura quinolínica enquanto candidatos para "drug repurposing" na DA	34
3.2. Métodos de síntese	38
IV. SÍNTESE DE DERIVADOS DE QUINOLINA COM ATIVIDADE AO NÍVEL DO COMPLEXO CDK5-P25	45
4.1. Síntese do composto (1)	47
4.2. Síntese do composto (2)	48
4.3. Síntese do composto (3)	51
4.4. Síntese do composto (4)	53
4.5. Procedimento experimental	55
4.5.1. Informações gerais sobre materiais e métodos	55
4.5.2. Síntese do composto (1), AS1S	56

4.5.3. Síntese do composto (2), AS2S.....	57
4.5.4. Síntese do composto (3), AS3S.....	58
V. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	60
5.1. Culturas primárias de neurónios corticais.....	60
5.1.1. Ensaio de neurotoxicidade induzida por glutamato.....	64
5.1.2. Ensaio de atividade de compostos antimaláricos.....	67
5.1.2.1. Ensaio de neuroproteção.....	68
5.1.3. Ensaio complementares	70
5.1.3.1. Preparação de lisados celulares.....	70
5.1.3.1.1. Preparação do tampão de lise e lise celular.....	70
5.1.3.2. Ensaio de viabilidade celular	71
5.1.3.3. Quantificação de proteínas totais	73
5.2. Resultados e discussão.....	74
5.2.1. Ensaio de neurotoxicidade por glutamato.....	74
5.2.2. Ensaio de neuroproteção por fármacos antimaláricos.....	76
VI. CONCLUSÃO	79
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
VIII. ANEXOS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1. Representação do processo de clivagem da APP.....	5
Figura I-2. Ilustração representativa do mecanismo de desregulação glutamatérgica, disrupção intracelular dos níveis de cálcio e excitotoxicidade.....	8
Figura I-3. Representação das estruturas químicas dos fármacos que atuam como inibidores da acetilcolinesterase, aprovados para a DA.....	12
Figura I-4. Representação da estrutura química da memantina, um antagonista de recetor NMDA.....	13
Figura III-1 Representação da estrutura quinolínic.....	27
Figura III-2. Representação da estrutura química do quinino (1) e dos seus derivados cloroquina (2), amodiaquina (3) e mefloquina (4).....	29
Figura III-3. Representação dos modelos farmacofóricos virtuais estabelecidos para os inibidores conhecidos do complexo CDK5-p25: roscovitina, aloisina A, inirubina-3-monoxima e diaminotiazole (1UNL, 1UNG, 1UNH e 3O0G, respetivamente).....	31
Figura III-4. Representação ilustrativa das interações hipotéticas esperadas entre o quinino e o sítio de ligação do ATP no complexo CDK5-p25.....	35
Figura III-5. Representação ilustrativa das interações hipotéticas esperadas entre a cloroquina e o sítio de ligação do ATP no complexo CDK5-p25.....	36
Figura III-6. Representação ilustrativa das interações hipotéticas esperadas entre a amodiaquina e o sítio de ligação do ATP no complexo CDK5-p25.....	37
Figura III-7. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Skraup.	38
Figura III-8. Representação de duas vias para o mecanismo de reação da síntese de Skraup.	39
Figura III-9. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Skraup-Doebner-Von Miller.	40
Figura III-10. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Friedländer.	40
Figura III-11. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Pfizinger.....	41
Figura III-12. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Conrad-Limpach.	41
Figura III-13. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Combès.	42

Figura III-14. Representação do esquema geral de síntese de quinolinas segundo o método de Povarov.	42
Figura III-15. Representação da reação de Povarov modificada.	42
Figura III-16. Representação do esquema geral de síntese de 4-hidroxi-2-oxo-quinolinas segundo o método de Arya <i>et al.</i>	43
Figura IV-1. Representação do esquema de síntese utilizado para preparação do composto-alvo (4).....	46
Figura IV-2. Representação do esquema de síntese do composto (1).....	47
Figura IV-3. Representação do esquema de síntese do composto (2).....	49
Figura IV-4. Representação das estruturas tautoméricas detetáveis do produto da reação correspondente ao passo ii da sequência de síntese.	50
Figura IV-5. Representação do esquema de síntese do composto (3).....	52
Figura IV-6. Representação do esquema de síntese do composto (4).....	53
Figura V-1. Representação ilustrativa da metodologia de distribuição e identificação adotada para o ensaio de tratamento das culturas neuronais com glutamato.....	66
Figura V-2. Representação das estruturas químicas do reagente resazurina e do produto resultante da sua redução metabólica, a resorufina.....	72
Figura V-3. Representação gráfica do efeito produzido pelo tratamento das culturas de neurónios corticais com glutamato 125 μ M, durante 15 minutos, seguido de tempos de recuperação de 3 horas (3h R), 6 horas (6h R) e 24 horas (24h R), e durante 24 horas contínuas (24h T). Os resultados estão apresentados sob a forma de percentagem de controlo (sem tratamento) e estão expressos em média \pm erro padrão da média (barras). * $p < 0,05$, diferença entre médias estatisticamente significativa. Análise através de teste <i>t-student</i>	75
Figura V-4. Representação gráfica do efeito produzido pelo tratamento das culturas de neurónios corticais com quinino (A), cloroquina (B) e amodiaquina (C) a concentrações de 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M. Os resultados estão apresentados sob a forma de percentagem de controlo (sem tratamento) e estão expressos em média \pm erro padrão da média (barras). * $p < 0,05$, diferença entre médias estatisticamente significativa. Análise através de teste <i>t-student</i> de Holm-Sidak.....	77
Figura VIII-1. Representação do modelo farmacofórico virtual estabelecido para o inibidor do complexo CDK5-p25 aloisina A (Identificação na base de dados PDB: 1UNH).....	92
Figura VIII-2. Representação do modelo farmacofórico virtual estabelecido para o inibidor do complexo CDK5-p25 indirubina-3-monoxima (Identificação na base de dados PDB: 1UNG).....	93

Figura VIII-3. Representação do modelo farmacofórico virtual estabelecido para o inibidor do complexo CDK5-p25 R-roscovitina (Identificação na base de dados PDB: 1UNL).....	94
Figura VIII-4. Representação do modelo farmacofórico virtual estabelecido para o inibidor do complexo CDK5-p25 diaminotiazole (Identificação na base de dados PDB: 3O0G).....	95
Figura VIII-5. Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto (1), AS1S.....	96
Figura VIII-6. Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto (2), AS2S.....	97
Figura VIII-7. Espectro de ¹³ C-RMN obtido para o composto (2), AS2S.....	98
Figura VIII-8. Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto (3), AS3S.....	99
Figura VIII-9. Espectro de ¹³ C-RMN obtido para o composto (3), AS3S.....	100

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema IV.1 - Proposta mecanística para a reação de síntese do composto (1).....	48
Esquema IV-2. Proposta mecanística para a reação de síntese do composto (2), obtido por ciclização de (1).....	50
Esquema IV-3. Proposta mecanística para a síntese do composto (3).....	52
Esquema IV-4. Proposta mecanística para a síntese do composto (4).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT** – Recetor serotoninérgico 5-hidroxitriptamina
- AChE** – Acetilcolinesterase, de acetylcholinesterase
- ADN** – Ácido Desoxirribonucleico
- AICD** – Fragmento amiloide com domínio intracelular, de *Amyloid precursor protein Intracelular Domain*
- AID** – Fragmento amiloide com domínio intracelular, *Amyloid Intracelular Domain*
- Ala** – Aminoácido alanina
- Ala** – Aminoácido alanina
- AMPA** – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropiónico, de *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
- APP** – Proteína precursora da amiloide, de *Amyloid Precursor Protein*
- Arg** – Aminoácido Arginina
- Asn** – Aminoácido asparagina
- Asp** – Aminoácido aspartato
- ATP** – Adenosina trifosfato
- A β** – Proteína beta-amiloide, de *Amyloid β*
- BCA** – Ácido bicinconínico, de *Bycinhoninic Acid*
- BSA** – Albumina de soro bovino, de *Bovine Serum Albumin*
- C83** – Fragmento carboxi-terminal de 83 aminoácidos da APP
- C99** – Fragmento carboxi-terminal de 99 aminoácidos da APP
- Ca²⁺** - Ião cálcio
- CBMR** - Centro de Investigação em Biomedicina, de *Center for Biomedical Research*
- CCMAR** – Centro de Ciências do Mar
- CDC2** – Proteína de ciclo de divisão celular 2 ou cinase dependente de ciclina 1, de *Cell Division Cycle protein 2*
- CDK** – Cinase dependente de ciclina, de *Cyclin dependente Kinase*
- Cys** – Aminoácido cisteína, de *cysteine*
- DA** – Doença de Alzheimer
- DMF** - Dimetilformamida
- DMSO** – Dimetilsulfóxido

DNase – Enzima de digestão do ADN

DTT – Ditioneitol

EOAD – Doença de Alzheimer precoce, de *Early Onset Alzheimer's Disease*

ERK1/2 – Cinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2, de *Extracellular signal-Regulated protein Kinases 1 and 2*

FAD – Doença de Alzheimer familiar, de *Familial Alzheimer's Disease*

FBS – Soro fetal bovino, de *Fetal Bovine Serum*

Gln – Aminoácido glutamina

Glu – Aminoácido glutamato

Gly – Aminoácido glicina, de *glycine*

GSK3 β – Cinase glicogénio sintetase 3 beta, de *Glycogen Synthase 3 β Kinase*

HBSS – Solução salina simples de Hank, de *Hank's Basic Salt Solution*

IC50 – 50% da concentração máxima inibitória

Ile – Aminoácido isoleucina

JNK – Cinases c-Jun N-terminais, de *c-Jun N-terminal kinases*

kDa – Quilodáton, de *kilodalton*

LOAD – Doença de Alzheimer tardia, de *Late Onset Alzheimer's Disease*

Lys – Aminoácido Lisina, de *Lysine*

mARN – Ácido Ribonucleico mensageiro

NFT – Tranças neurofibrilares, de *Neurofibrillary Tangles*

nM - nanómetro

NMDA – N-metil-D-aspartato

PBS – Tampão fosfato-salino, de *Phosphate Buffered Saline*

Phe – Aminoácido fenilalanina, de *phenylalanine*

PPA – Ácido polifosfórico, de *Polyphosphoric acid*

Pro – Aminoácido Prolina

PSEN1 – Presenilina 1

PSEN2 – Presenilina 2

RMN – Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

SAD – Doença de Alzheimer esporádica, de *Sporadic Alzheimer's Disease*

sAPP α – Fragmento extracelular solúvel da APP α , de *soluble APP fragment α*

sAPP β – Fragmento extracelular solúvel da APP β , de *soluble APP fragment β*

Ser – Aminoácido Serina

SNC – Sistema Nervoso Central

SP – Placas senis, de *Senile Plaques*

Thr – Aminoácido Treonina, de *Threonine*

TLC – Cromatografia em camada fina, de *Thin Layer Chromatography*

TMS – Tetrametilsilano

TPKII – Proteína cinase da tau II, de *Tau Protein Kinase II*

Val – Aminoácido valina

INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa crônica, irreversível e fatal. Caracteriza-se por morte neuronal, atrofia cerebral e perda progressiva de memória e das capacidades cognitivas, com aparecimento de distúrbios comportamentais e funcionais. Estas manifestações clínicas integram a DA numa família de doenças com acometimento cerebral designadas por demências, da qual fazem parte outras patologias como a Demência Vascular, Demência com Corpos de Lewi, Demência Mista, Doença de Parkinson, Demência Frontotemporal, Doença de Creutzfeldt-Jakob, Doença de Huntington, Hidrocefalia de Pressão Normal, a Síndrome de Wernicke-Korsakoff, entre outras, e representa 60% a 80% de todos os casos. A sua etiologia é complexa e multifacetada, sendo que o fator desencadeante dos seus fenómenos fisiopatológicos permanece desconhecido. No entanto, vários estudos sugerem a interação entre fatores ambientais e uma predisposição genética do indivíduo enquanto responsáveis pela expressão da doença, sendo a idade o principal fator de risco^{1,2}.

1.2. História

Em 1907, o psiquiatra alemão Alois Alzheimer relatou o caso de uma das suas doentes, Auguste Deter, uma mulher de cinquenta e um anos, que apresentava um quadro clínico de ciúme patológico perante o marido, comprometimento cognitivo e da memória, desorientação, alucinações e frequentemente comportamentos erráticos e agressivos. Ao fim de quatro anos de doença mental de rápida deterioração, a doente faleceu num estado de demência total, sendo submetida a uma autópsia. Embora na altura já existisse algum conhecimento das manifestações clínicas desta doença, foram os resultados da autópsia que permitiram a Alzheimer correlacionar a severidade e o diagnóstico da doença com dois fenómenos fisiopatológicos salientes que observou no cérebro da paciente, placas senis e tranças neurofibrilares, que então classificou como numerosas lesões focais corticais e emaranhados densos de fibrilhas intraneuronais, respetivamente, e atualmente correspondem aos dois marcos caracterizadores da doença^{3,4}.

Com base nessas observações foi possível reconhecer uma nova forma de demência, inicialmente designada “doença dos idosos”, “psicose senil”, entre outros, que passou a designar-se Doença de Alzheimer, numa fase posterior, em homenagem ao seu descobridor. Contudo, apesar dos relatos de Alzheimer e da sua descrição da doença, apenas cerca de seis décadas depois começou a perceber-se a biologia e neuropatologia desta doença e foi possível distinguir com maior rigor a DA das restantes demências^{4,5}.

1.3. Epidemiologia

O aumento da esperança média de vida verificada ao longo dos últimos tempos catapultou uma mudança progressiva do foco nas doenças infecciosas para as doenças crónicas. Hábitos e estilos de vida impróprios, adotados pelas populações, tendencialmente promovem o aparecimento das mesmas e exacerbam o seu impacto, contribuindo para um aumento drástico nos valores de prevalência. A Doença de Alzheimer representa uma das doenças crónicas cujo aumento progressivo se tem tornado alarmante, representando atualmente a forma de demência com maior impacto a nível mundial. Afeta ambos os sexos em proporções semelhantes, embora existam registos de um número superior de prevalência em mulheres em determinadas regiões^{1,6}. No total, mais de 46,8 milhões de pessoas viviam com esta doença em 2015 e estima-se que até ao ano de 2050 este valor triplique para os 131,5 milhões⁶.

Em Portugal, segundo o “Plano Nacional de Intervenção Alzheimer”, elaborado em 2009 pela associação Alzheimer Portugal, o número estimado de doentes com demência atingia um valor aproximado de 153000 nesse ano, dos quais 90000 correspondiam à DA. Todavia, este valor considera-se atualmente desatualizado e sub-estimado, dada a existência de um grave problema de sub-diagnóstico e sub-registo desta patologia, no nosso país e na Europa⁷⁻⁹.

A federação internacional das sociedades para a DA “Alzheimer’s Disease International” (ADI) publica anualmente o relatório World Alzheimer Report, no qual apresenta os dados associados à Doença de Alzheimer atualizados a nível mundial. No que toca aos custos associados, em 2010 foi estimado um valor próximo de 604 mil

milhões de dólares exclusivos para a demência, incluindo a DA, com gastos anuais próximos de 23 mil milhões, um valor que equivalia aos gastos em saúde com doenças como cancro, doença cardiovascular e AVC, em simultâneo¹⁰. Atualmente, estima-se um custo superior a 818 mil milhões de dólares associados à demência, valor registado no último relatório publicado, em 2016¹¹.

A doença de Alzheimer constitui assim uma das doenças crónicas de intervenção prioritária, não só devido ao impacto a nível social e económico, mas também a nível pessoal, pela perda de capacidades e de independência que resulta na necessidade de cuidados permanentes. Torna-se premente investir na investigação aprofundada dos mecanismos da doença e na descoberta de fármacos inovadores que controlem a progressão da doença, de modo a permitir à população idosa um envelhecimento digno e adequado segundo os critérios sociais atualmente aceites.

1.4. Fisiopatologia da DA

A fisiopatologia da doença de Alzheimer permanece elusiva até aos dias de hoje. Apesar de ser uma patologia extensamente estudada desde a sua descrição por Alois Alzheimer, não existe ainda um consenso acerca da sua etiologia. Várias hipóteses foram sendo propostas com o intuito de explicar os mecanismos da doença, nomeadamente a cascata da beta-amiloide (A β), a hipótese colinérgica, a hipótese da tau e a hipótese da inflamação, entre outras, mas nenhuma destas apresenta evidência substantiva que lhe garanta aceitabilidade universal ¹².

Sabe-se, todavia, que existem duas proteínas-chave associadas à DA, a A β e a tau, pois representam os componentes monoméricos das lesões macroscópicas “positivas” da doença, as placas senis (SP) e tranças neurofibrilares (NFT), que acometem preferencialmente regiões como o córtex e o hipocampo cerebrais, resultando na atrofia cerebral característica da doença. Até à data, as placas senis e as tranças neurofibrilares constituem os únicos fenómenos que permitem confirmar a doença, embora já numa fase *post-mortem* ^{13,14}.

1.4.1. A proteína beta-amiloide e as placas senis

Segundo muitos autores, o principal indutor do processo neurotóxico da DA é a proteína β -amiloide¹⁵⁻¹⁹. Trata-se de um péptido endógeno resultante do processamento da proteína precursora da amiloide, APP. A APP localiza-se nas membranas neuronais, particularmente na proximidade das fendas sinápticas, e pensa-se estar envolvida em processos de regulação e reparação neuronal. Após a sua produção, a APP sofre um processo complexo de clivagem proteolítica mediada por uma família de endoproteases transmembranares designadas por secretases. Numa primeira fase a clivagem ocorre segundo duas vias possíveis, uma mediada pelas α -secretases, comumente designada por não amiloidogénica, e a segunda, a via amiloidogénica, mediada pelas β -secretases. Posteriormente, os péptidos resultantes de cada uma das vias são submetidos a novo processo de clivagem, mediado por γ -secretases que utilizam as proteínas presenilina 1 e 2 como subunidades catalíticas^{13,18,20}.

Quando a APP é clivada pela α -secretase, são formados dois produtos, um fragmento extracelular solúvel, sAPP α , e um fragmento transmembranar carboxi-terminal de 83 aminoácidos, C83, sendo este último sujeito a segunda clivagem mediada pela γ -secretase. Os produtos finais gerados pela via da α -secretase são o fragmento amiloide com domínio intracelular AICD ou AID e o péptido p3, sem função endógena estabelecida^{13,18}.

Relativamente à via amiloidogénica, os produtos resultantes da clivagem pela β -secretase são o sAPP β , um fragmento extracelular solúvel mais curto que o anterior, e um fragmento transmembranar carboxi-terminal de 99 aminoácidos C99, que sofre posterior clivagem pela γ -secretase, originando o fragmento AICD, presente também na via não-amiloidogénica, e um péptido com 40 a 42 aminoácidos, a proteína beta-amiloide^{5,13,18,20} (vidé figura I-1).

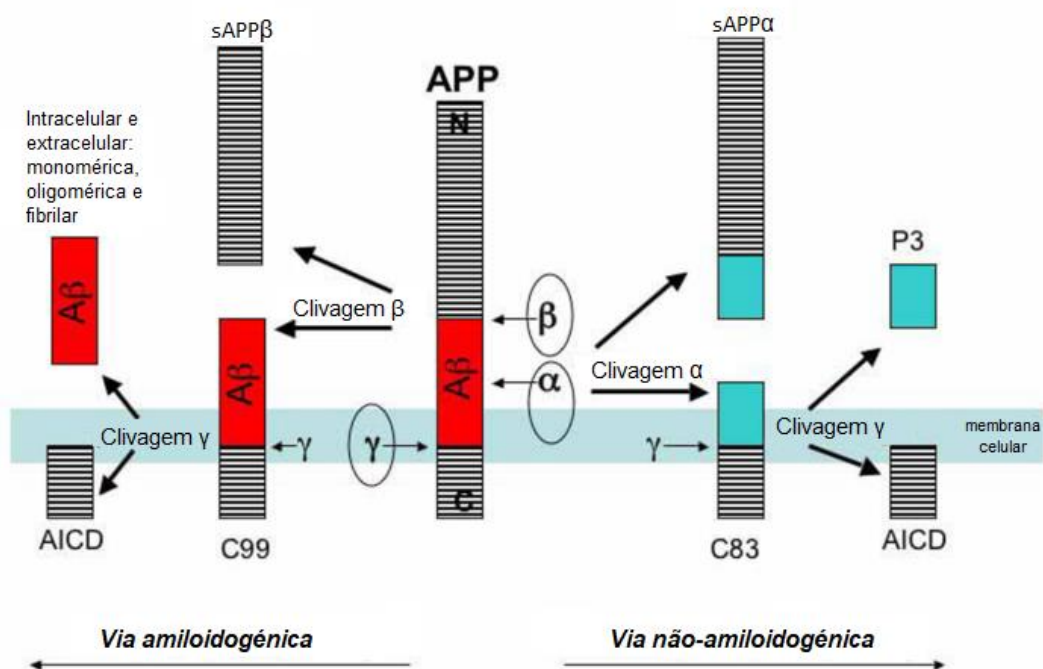


Figura I-1. Representação do processo de clivagem da APP (Adaptado de ²¹).

De notar que o comprimento do péptido Aβ varia consoante o padrão de clivagem da APP na porção C-terminal, dando origem a duas isoformas, a Aβ₁₋₄₀, que é solúvel e mais prevalente, e a Aβ₁₋₄₂, cuja natureza é hidrofóbica, insolúvel e apresenta uma maior tendência para agregar. A agregação de péptidos de Aβ dá origem às placas senis características da DA ²².

A descoberta do processo de síntese da β-amiloide introduziu uma revolução no conhecimento da doença porque permitiu associar as formas precoces da DA familiar com a presença de mutações importantes em genes que codificam para proteínas intervenientes neste processo, nomeadamente a APP e as presenilinas, destacando a relevância da Aβ em todo o mecanismo da doença.

Durante muitas décadas a formação de placas senis foi considerado o evento preponderante na neurotoxicidade cerebral. Porém, com base em observações mais recentes, o paradigma mudou. Yang *et al.* mostraram que as estruturas oligoméricas e solúveis de beta-amiloide extraídas de lisados corticais de doentes com DA são muito mais neuroativas do que as estruturas de elevado peso molecular, conduzindo a processos neurotóxicos a vários níveis, desde a modificação da plasticidade sináptica,

declínio cognitivo, hiperfosforilação da tau e redução da transmissão beta adrenérgica, até à ativação da microglia e estimulação da neuroinflamação^{23,24}. Outros autores chegaram a conclusões semelhantes em estudos paralelos, pelo que atualmente a teoria da cascata da beta-amilóide baseia-se num modelo assente sobre as formas monoméricas e oligoméricas solúveis da A β enquanto causadores dos eventos neurotóxicos associados à DA, ao invés dos agregados que constituem as placas senis. Neste modelo, pressupõe-se que as placas amiloides assumem um papel protetor sendo que a formação das mesmas contribui para uma inibição da neurodegeneração por sequestro das formas menores monoméricas e oligoméricas deletérias, inibindo os eventos subsequentes por estas desencadeados^{20,25,26}.

1.4.2. A proteína tau e as tranças neurofibrilares

Paralelamente à acumulação de beta-amilóide, as regiões cerebrais afetadas pela DA exibem ainda inclusões intracelulares em forma de fibras emaranhadas na região perinuclear do citoplasma, as tranças neurofibrilares. As NFT representam o segundo fenómeno neuropatológico característico da DA e resultam da agregação intraneuronal de proteínas tau hiperfosforiladas e com conformações espaciais anormais. Em situações neurotóxicas ocorre um aumento aberrante dos níveis de fosforilação das proteínas tau no citosol neuronal, provocando a sua polimerização em filamentos helicoidais emparelhados e retos que dão origem às tranças neurofibrilares. Este fenómeno perturba a função endógena da tau, que é responsável pela estabilização dos microtúbulos, causando alterações estruturais e funcionais no citoesqueleto celular. Consequentemente, os neurónios perdem a sua morfologia e funções, iniciando-se o processo de neurodegeneração^{22,27}.

Apesar de se situar a jusante da beta-amiloide na cascata de fenómenos que conduzem à neurodegeneração²⁸, curiosamente, o papel de principal mediador do processo neurotóxico tem vindo a ser atribuído à patologia da tau por diversos autores, sobretudo devido à identificação de casos de doentes com uma elevada carga de placas senis e ausência de comprometimento cognitivo, ou ainda, devido à observação do

fenómeno de resistência à toxicidade pela A β em neurónios que não expressam a tau^{27,29-32}.

Para além disso, estudos imagiológicos confirmam uma correlação entre o declínio cognitivo e a progressão das tranças neurofibrilares mesmo em estadios pré-demência da doença, facto que leva a acreditar que a atuação na tau possa ser a resposta que se procura para fazer face à deterioração observada³³.

1.4.3. Glutamato, recetor NMDA e excitotoxicidade

A atividade neuronal no cérebro depende de uma regulação rigorosa entre uma neurotransmissão excitatória e inibitória. O glutamato é um intermediário essencial neste processo. Representa o neurotransmissor excitatório principal do SNC³⁴ e a sua acumulação foi associada à patologia da DA por diversos autores após a observação de fenómenos como sub-expressão de transportadores de glutamato em cérebros *post-mortem* de doentes com DA e comprometimento geral dos recetores glutamatérgicos resultante da ligação de formas oligoméricas de A β ^{16,35}. Quando libertado nas sinapses glutamatérgicas, o glutamato atua em receptores excitatórios ionotrópicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), e é reciclado do espaço extracelular por meio de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT). A sobreativação dos receptores do glutamato conduz a um influxo excessivo de iões de cálcio. Geralmente, os níveis de cálcio na célula são cuidadosamente regulados através de uma colaboração íntima entre vários componentes celulares que coordenam os mecanismos de entrada, sequestro e remoção de Ca²⁺. Mediante exposição prolongada ao glutamato, ocorre uma sobrestimulação dos recetores NMDA e abertura contínua do canal iónico acoplado, pela deslocação do magnésio responsável pelo bloqueio do canal. Consequentemente o influxo de cálcio excede os níveis normais, ocorre saturação da capacidade de tamponização pelas mitocôndrias e inicia-se uma ativação de diversos processos de degradação subcelulares nocivos para as células neuronais, excitotoxicidade e apoptose^{16,22,36,37}.

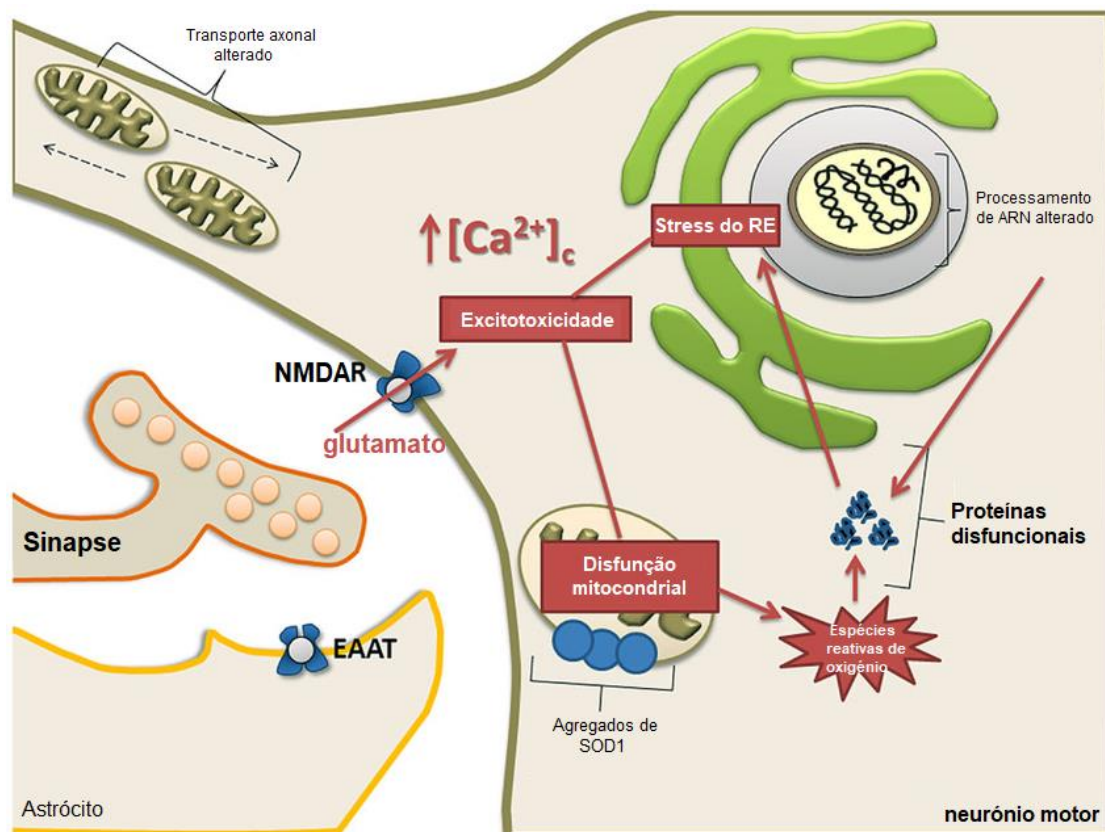


Figura I-2. Ilustração representativa do mecanismo de desregulação glutamatergica, disrupção intracelular dos níveis de cálcio e excitotoxicidade (*Adaptado de* ³⁸).

Foi demonstrado que a beta-amilóide está envolvida no processo de disrupção glutamatergica e consequente alteração na homeostasia do cálcio intracelular ³⁹ através da eliminação das conexões sinápticas excitatórias no SNC⁴⁰, quer pelas formas solúveis oligoméricas⁴¹, quer pela forma agregada que compõe as placas senis⁴², o que indica que a sua presença é essencial para desencadear a neurotoxicidade por excitotoxicidade. Por outro lado, verificou-se que o aumento dos níveis de cálcio intracelular induz a ativação de enzimas proteolíticas, nomeadamente as calpaínas³⁷, que assumem um papel primordial na ativação do processo de hiperfosforilação da tau por clivarem a subunidade reguladora de uma das principais cinases da tau, CDK 5, e favorecerem a formação do complexo CDK5-p25⁴³, abordado detalhadamente no capítulo seguinte.

1.5. Tipos de DA

Quanto à etiologia, a Doença de Alzheimer manifesta-se de duas formas, a DA familiar e a DA esporádica. De um modo geral, a forma familiar associa-se a mutações génicas hereditárias e uma apresentação clínica extremamente rara, enquanto a forma esporádica diz respeito à forma de apresentação comum e associa-se a fenómenos esporádicos e idiopáticos. Porém, estudos recentes demonstram um envolvimento cada vez mais significativo de mutações génicas também na forma esporádica, embora neste caso se trate de múltiplas mutações que exibem padrões de interação entre si e uma variável não genética, afastando-se da vertente Mendeliana característica da forma familiar⁴⁴⁻⁴⁷.

São três os principais genes suscetíveis às mutações autossómicas dominantes responsáveis pelo aparecimento da FAD: PSEN1, gene situado no cromossoma 14, que expressa a proteína presenilina 1; PSEN2, localizado no cromossoma 1, que codifica para a proteína presenilina 2; e APP, gene da proteína precursora da amilóide β , situado no cromossoma 21⁴⁸. Todas as proteínas supracitadas estão envolvidas no processamento da proteína A β , sendo que a maioria destas mutações traduzem-se num aumento na concentração de A β por favorecerem a produção das formas “longas” da proteína, péptidos com 42 resíduos, mais suscetíveis a agregar e a formar depósitos no cérebro⁴⁹.

A DA pode ainda classificar-se quanto ao seu início como precoce (EOAD) e tardia (LOAD), quando surge antes e depois dos 65 anos de idade, respetivamente. Geralmente, o início precoce ocorre em doentes portadores da forma familiar e o tardio coincide com a forma esporádica da doença^{45,47,50}.

1.6. Terapêutica

As alternativas terapêuticas para a doença de Alzheimer são ainda bastante escassas. Os fármacos utilizados carecem de propriedades preventivas ou curativas, atuando apenas por alívio sintomático e desaceleração da progressão natural dos processos patológicos, facto que se deve essencialmente ao desconhecimento dos mecanismos exatos da doença⁵¹. Enquanto não se dispõe de opções terapêuticas

modificadoras da doença, o objetivo essencial do tratamento prende-se com a implementação de um regime que confira o maior benefício ao doente a múltiplos níveis, desde cognitivos e comportamentais até uma gestão mais eficiente da doença pelo próprio doente e pelos seus cuidadores na realização das atividades diárias.

1.6.1. Inibidores da acetilcolinesterase

Durante muitos anos, o modelo teórico mais aceite para a perda cognitiva típica da DA assentava numa vertente associada a um défice colinérgico, ainda que não enquanto fenómeno causador da doença, mas sim enquanto resultado de processos moleculares patológicos desconhecidos. Estudos histológicos e imagiológicos possibilitaram a confirmação da suspeita de declínio da atividade colinérgica, revelando perda substancial de neurónios colinérgicos, acetilcolina, colina acetil-transferase e hiperatividade das acetilcolinesterases e recaptção da acetilcolina. Contrariamente, os recetores colinérgicos pós-sinápticos permaneciam relativamente intactos na DA. Como tal, apostou-se em fármacos modificadores da degeneração colinérgica para aumentar a atividade colinérgica e a cognição, tendo sido aprovados quatro fármacos inibidores da acetilcolinesterase (AChE): **tacrina**, **rivastigmina**, **galantamina** e **donepezilo**. A AChE é a enzima responsável pela degradação da acetilcolina na fenda sinática, sendo que a sua inibição aparentou constituir uma abordagem promissora para a preservação dos níveis de acetilcolina a nível cerebral ⁵¹⁻⁵³.

A **tacrina** foi a primeira molécula inibidora da AChE a ser utilizada, mas foi retirada do mercado posteriormente devido a fragilidades do fármaco, nomeadamente um tempo de semivida curto, e à descoberta de efeitos adversos severos associados à sua utilização, nomeadamente hepatotoxicidade e efeitos colinérgicos nocivos. Estes problemas foram contornados pelo desenvolvimento da segunda geração de inibidores da acetilcolinesterase: galantamina, rivastigmina e donepezilo ⁵⁴.

Embora estes fármacos pertençam à mesma classe farmacológica, possuem estruturas químicas distintas e interagem com o alvo (AChE) de modos diferentes. A **galantamina** é um agente alcalóide terciário que, para além de inibir de forma reversível e competitiva a acetilcolinesterase, interage com o sítio alostérico dos recetores

nicotínicos, melhorando a função colinérgica. Como tal, é indicada a doentes com DA leve a moderada ⁵⁵.

A **rivastigmina**, por sua vez, é um carbamato benzílico que, pelas suas propriedades químicas, reage com um hidroxilo serínico da AChE, permanecendo ligada ao local ativo por um período de tempo muito superior ao do grupo acetato, o que lhe confere propriedades inibitórias mesmo depois de se gastar todo o composto de partida em circulação. Por essa razão, a rivastigmina é considerada um inibidor pseudo-irreversível da enzima. É seletiva para as colinesterases cerebrais e possui a particularidade de interagir não só com a acetilcolinesterase, mas também com a butirilcolinesterase, resultando numa preservação da atividade sináptica mais eficiente em fases mais avançadas da doença. Devido a um tempo de semivida mais curto, a rivastigmina foi inicialmente aprovada para as formas leves a moderadas da doença. Porém, em 2013 foi aprovado o sistema transdérmico, que veio reverter o problema inicial, e atualmente a rivastigmina pode ser igualmente utilizada em doentes com uma doença mais severa ^{54,56}.

Por fim, o **donepezilo**, estruturalmente, é um derivado de piperidina que exerce uma inibição reversível e não competitiva da acetilcolinesterase. Embora inicialmente aprovado para a DA leve a moderada, o donepezilo é atualmente indicado também para as formas severas da doença, representando o fármaco mais prescrito desta categoria ^{54,57}.

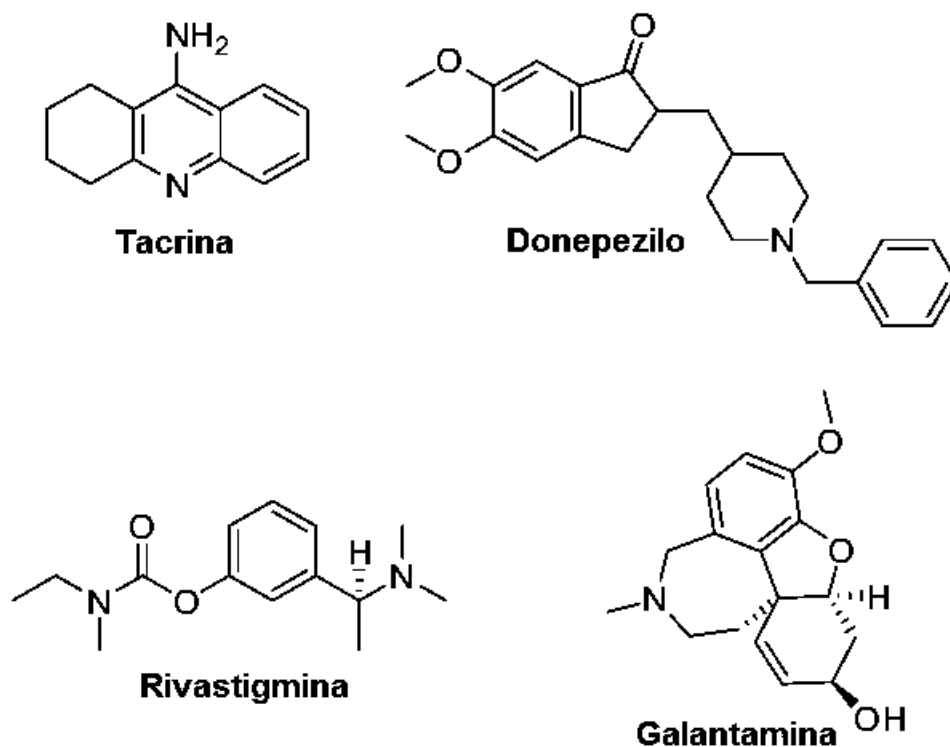


Figura I-3. Representação das estruturas químicas dos fármacos que atuam como inibidores da acetilcolinesterase, aprovados para a DA (*Adaptado de* ⁵⁸).

1.6.2. Antagonistas dos recetores NMDA

Com base na disrupção glutamatérgica e hiperatividade dos recetores NMDA, apostou-se no desenvolvimento de antagonistas deste recetor, tendo surgido a **memantina**, o 4º fármaco atualmente aprovado para o tratamento das formas moderadas a severas da DA, utilizado em regime de monoterapia ou em associação com um inibidor da colinesterase. A utilização da memantina nas formas leves a moderadas não apresenta benefícios clínicos acrescidos, sendo por isso restrita às formas mais avançadas ⁵⁴.

Estruturalmente a memantina é um derivado da amantadina, que antagoniza de forma não competitiva o recetor NMDA, bloqueando-o numa conformação de canal aberto⁵⁹. A característica favorável da memantina reside na sua capacidade de impedir a atividade excessiva do recetor, sem comprometer o seu funcionamento normal ^{60,61}.

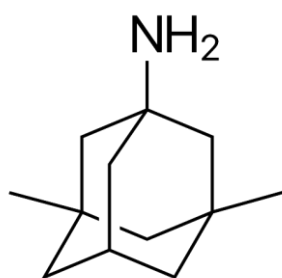


Figura I-4. Representação da estrutura química da memantina, um antagonista do recetor NMDA.

Para além da sua atividade inibitória ao nível da sobreestimulação de recetores NMDA pelo glutamato, foi demonstrada a atividade da memantina noutros alvos interessantes do ponto de vista das doenças neurodegenerativas e outras patologias neurológicas, nomeadamente inibição de alguns recetores nicotínicos, do recetor serotoninérgico 5-HT₃, do recetor sigma-1 e, ainda, inibição da recaptação de alguns neurotransmissores como a serotonina e a dopamina, possuindo um efeito positivo também no processo de libertação deste último ^{62,63}.

Pelas razões supracitadas e tendo em conta a perda progressiva da função colinérgica com o avançar da doença, a memantina constitui a opção mais viável a longo prazo de entre as opções terapêuticas preexistentes, embora insuficiente para proporcionar uma solução definitiva aos doentes com DA. Como tal, torna-se necessário investir em estudos que permitam o desenvolvimento de novas terapêuticas capazes de modificar o curso natural desta patologia, resultando em respostas eficazes a longo prazo.

1.7. Fatores de risco

Embora não seja possível atribuir uma causa ao aparecimento da DA, em parte devido ao seu carácter multifacetado e etiologia complexa, foram associados à doença vários tipos de fatores de risco, nomeadamente genéticos, psicossociais e cardiovasculares³⁴. Relativamente aos fenómenos genéticos, com base no suprarreferido, sabe-se que as mutações nos genes de algumas proteínas intervenientes

no processo de síntese de A β , APP, PSEN1 e PSEN2 estão presentes na maioria dos casos de DA familiar, havendo estudos que apontam também para uma componente genética na forma esporádica, o que confere aos fenómenos genéticos uma posição de topo no risco de DA ^{34,44,45,49}.

Por outro lado, várias evidências indicam que os fatores de risco associados a doenças cardiovasculares também podem potenciar a DA, como é o caso da obesidade, colesterol elevado, diabetes, hipertensão, tabagismo, entre outros, por intervirem em modificações anatómicas e fisiológicas que predispõem para o aparecimento da DA, nomeadamente a redução da circulação sanguínea cerebral, alterações morfológicas na vasculatura, alterações na permeabilidade da barreira hemato-encefálica, etc ⁶⁴.

Por fim, com base na hipótese da reserva cognitiva observou-se uma maior predisposição para a DA nas situações de subestimulação cognitiva e níveis educacionais reduzidos. Embora não haja proteção contra o aparecimento da doença em doentes com elevados níveis educacionais e maior estimulação e atividade cerebral, verificou-se um aumento nas densidades sinápticas e formação de redes neuronais mais complexas e eficientes, conferindo-lhes uma certa neuroproteção ⁶⁵.

Como tal, tendo em conta a complexidade desta doença, o tratamento da DA passa primeiramente pela prevenção e redução dos fatores predisponentes.

Página intencionalmente deixada em branco

II. NOVOS ALVOS

Apesar da oferta de um alívio sintomático estatisticamente significativo, a eficácia limitada das terapêuticas atuais para a DA exige o desenvolvimento de novos fármacos que diminuam ou impeçam a progressão da doença. Como tal, surgiu a necessidade de apostar em novos alvos, associados a processos considerados essenciais para a evolução da neuropatologia, destacando-se como principais categorias:

- a) As alterações metabólicas e insulinoresistência neuronal;
- b) As alterações inflamatórias associadas a regiões do cérebro afetadas pela DA;
- c) A produção de formas patológicas da proteína tau;
- d) A produção, agregação e clearance da proteína beta-amilóide ²⁰.

2.1. A proteína tau

A proteína tau foi descrita em 1975 por Weingarten *et al.* que, ao estudarem a polimerização dos microtúbulos, a identificaram como uma proteína essencial para o processo.⁶⁶ Os microtúbulos são estruturas tubulares presentes numa diversidade de componentes celulares, envolvidos na mobilidade, estrutura e/ou suporte da célula. Desempenham igualmente um papel fundamental a nível axonal em células nervosas no que toca ao transporte e à neurotransmissão. Resultam da polimerização da tubulina quando complexada com a tau ^{66,67}.

A tau distribui-se maioritariamente no cérebro, com preferência pelos neurónios. No interior dos neurónios, em células imaturas, uma tau com elevado nível de fosforilação ocupa ubiquitariamente toda a célula, migrando para os axónios durante a maturação, à medida que diminuem os níveis de fosforilação. Estruturalmente, contém quatro domínios principais: um domínio amino-terminal ácido, um domínio rico em resíduos de prolina, um domínio de ligação aos microtúbulos e uma pequena sequência carboxi-terminal de 71 aminoácidos. Apresenta seis isoformas no SNC, resultantes de splicing alternativo, sendo que, em diferentes etapas do desenvolvimento neuronal, existe uma predominância de diferentes isoformas. Durante as fases precoces de desenvolvimento do SNC, as isoformas altamente fosforiladas

contribuem para a plasticidade sináptica, culminando com o predomínio das formas não fosforiladas nos neurónios maduros, que se ligam à tubulina promovendo a sua polimerização e a estabilização dos microtúbulos. Essa estabilização é conseguida através de uma interação do domínio da tau carregado positivamente com as cargas negativas dos microtúbulos ^{30,68,69}.

Para além do seu papel na dinâmica dos microtúbulos, designadamente no transporte axonal, na organização do citoesqueleto e na divisão mitótica, verificou-se uma participação desta proteína em diversos processos fisiológicos do SNC, como na regulação da atividade neuronal, neurogénese e plasticidade sináptica, particularmente no aumento da depressão sináptica de longa duração. Porém, importa referir que, no contexto desta monografia, a proteína tau surge pelo seu potencial patogénico e envolvimento numa série de patologias neurodegenerativas, designadas tauopatias, nas quais a Doença de Alzheimer assume uma relevância primordial ^{69,70}.

2.2. Tauopatias

As tauopatias são um grupo de doenças neurodegenerativas heterogéneas que partilham como elemento comum a abundância de lesões cerebrais compostas por formas insolúveis e hiperfosforiladas da proteína tau. Fazem parte deste grupo de doenças a Doença de Alzheimer, a Demência Frontotemporal com Parkinsonismo ligada ao cromossoma 17, a Doença de Pick, a Degeneração Corticobasal, a Demência Pugilística e a Paralisia Supranuclear Progressiva ⁷¹.

Diversas modificações pós-traducionais da tau foram descritas enquanto processos passíveis de causar as tauopatias, nomeadamente a ubiquitinação, a acetilação, a metilação, a nitratação, o encurtamento e, por fim, a fosforilação, que corresponde ao processo alterado da tau melhor caracterizado até à data ⁷².

Na doença de Alzheimer, a patologia da tau manifesta-se pelo aparecimento das tranças neurofibrilares, consequentes ao emparelhamento de filamentos helicoidais e retos de tau hiperfosforilada ⁶⁹.

2.2.1. Hiperfosforilação da tau

Em toda a sua extensão, a tau possui 85 resíduos fosforiláveis, de entre os quais 45 são resíduos de serina, 35 de treonina e 5 de tirosina. A fosforilação normal da tau baseia-se num balanço muito controlado entre atividades enzimáticas de cinases e fosfatases ⁷³. Na DA existe uma fosforilação excessiva, tanto nas posições fisiológicas como em posições não fisiológicas, resultando num valor que ronda os 45 aminoácidos fosforilados em doentes afetados. Frequentemente, a fosforilação ocorre nos resíduos de serina ou treonina seguidos por prolina (sequências (Ser/Thr)-Pro), pelo que as cinases envolvidas são sobretudo cinases dirigidas por prolina, ainda que não tenha sido possível até à data discriminar quais as que são diretamente responsáveis por causar a patologia. A título de exemplo, enumeram-se as enzimas candidatas para o processo de hiperfosforilação: GSK3 β , CDK5, CDC2, ERK1/2, PKA, MAPK. Cada uma destas enzimas demonstra preferência por substratos próprios, distintos entre si. A CDK5 atua preferencialmente em sequências (Ser/Thr)-Pro com um aminoácido básico na segunda posição C-terminal, (Ser/Thr)-Pro-X-(Lys/Arg), com X a designar qualquer aminoácido; a ERK1/2 tem maior apetência por sequências flanqueadas por prolina, Pro-X-(Ser/Thr)-Pro; e a GSK3 β opta por sequências (Ser/Thr)-(X)₃-(pSer/pThr), fosforilando preferencialmente o resíduo de serina ou treonina da posição 4 C-terminal ^{68,69}.

Relativamente aos epítomos fosforilados da tau, não existe ainda consenso entre autores devido a divergências nos resultados obtidos com a utilização de métodos distintos. Todavia, destacam-se alguns locais identificados mediante reconhecimento por anticorpos desenvolvidos especificamente para a tau da DA, como a Ser396 e a Ser405, reconhecidas pelo PHF1, a Ser202 e a Thr205, reconhecidas por anticorpos do tipo AT8, a Thr231 e a Ser235, identificados pelo AT180, a Thr181, reconhecida pelo AT270, a Thr212 e a Ser214, complexados pelo AT100 ^{32,68}.

Dado o elevado número de resíduos fosforiláveis, uma estimulação dos processos de fosforilação provoca um impacto profundo no funcionamento normal da proteína: ocorre uma perda da capacidade de estabilização dos microtúbulos, surgem deficiências axonais e predomina uma forma agregada da tau que migra da sua localização fisiológica axonal para os compartimentos somatodendríticos onde se formam as tranças neurofibrilares. Simultaneamente, ocorre uma retração das espinhas

dendríticas mediada pelo influxo de cálcio através dos recetores NMDA, causando uma perda da comunicação interneuronal. A localização da tau é essencial no potencial diagnóstico da DA, pois a sua deslocalização para os compartimentos somatodendríticos constitui um dos sinais mais precoces da neurodegeneração ^{30,74}.

Ademais, a hiperfosforilação promove efeitos nocivos a outros níveis, tais como:

- i. alteração da integridade do ADN e uma modificação global na transcrição proteica;
- ii. disrupção do percurso fisiológico de degradação da tau pelo proteossoma, na medida em que uma fosforilação nos resíduos Ser262 e Ser356 impede o seu reconhecimento pelo complexo de degradação;
- iii. alteração da interação fisiológica da tau com outros intervenientes em processos celulares, alterando diversos processos de sinalização ^{49,51}.

2.2.1.1. Proteína CDK5

Uma das principais vias que conduzem à hiperfosforilação da tau envolve a proteína cinase dependente de ciclina 5, CDK5. Esta proteína faz parte de uma família de 20 cinases de serina/treonina, classificadas numericamente consoante a sua descoberta. Caracterizam-se pela ligação que estabelecem com uma classe de subunidades complementares essenciais para a sua ativação e função, as ciclinas. As ciclinas são péptidos reguladores dos complexos que formam com as respetivas subunidades catalíticas CDK e a sua designação provém do papel que desempenham no ciclo celular e da sua abundância ciclicamente variável no decorrer do mesmo. A família das CDK foi inicialmente descrita pelo seu destaque na regulação do ciclo celular, sendo que, ao longo do tempo, uma evolução divergente estimulou uma especialização e consecução de variadas funções às novas CDK, nomeadamente transcrição, tradução e processamento de mARN, facto que permitiu agrupá-las consoante as suas propriedades e funções ⁷⁵⁻⁷⁷.

A CDK5 foi primeiramente purificada a partir de uma fração de microtúbulos de cérebro bovino e identificada como uma das duas cinases da proteína tau, TPKII. Posteriormente foi identificada por outro investigador, também após extração de

cérebro bovino, como uma cinase do tipo CDC2 neuronal, NCDK, e em seguida um terceiro investigador classificou-a como uma proteína cinase de sequências (Lys-Ser-Pro) após extração de medula espinal de rato ³². No ser humano, a CDK5 é responsável por assegurar a citoarquitetura e o correto desenvolvimento do SNC através da fosforilação de um arsenal complexo de substratos, participando ainda em múltiplos processos fisiológicos, como a regulação do citoesqueleto, o transporte membranar, a orientação axonal, a função sináptica, a sinalização dopaminérgica e a dependência, pelo que a sua ausência traduz-se em mortalidade perinatal, desorganização da laminação cortical e em defeitos a nível da migração neuronal, de acordo com estudos utilizando modelos animais ⁷⁸.

Apesar da homologia estrutural em cerca de 55 a 60% da sequência de aminoácidos, a CDK5 distingue-se funcionalmente das CDK clássicas na medida em que, enquanto estas são ativadas na fase de divisão celular e promovem a regulação do ciclo celular, a CDK5 não tem funções definidas no ciclo celular, atuando predominantemente em neurónios pós-mitóticos. Para além disso, a ativação das CDK clássicas depende da complexação com uma ciclina e da fosforilação do sítio de ligação do ATP, hélice T, por uma outra cinase, a CDK7, o que no caso da CDK5 não acontece. Na CDK5, as subunidades reguladoras são os péptidos p35 e p39, ou as respetivas formas truncadas p25 e p29, cuja ligação à subunidade catalítica CDK5 através do domínio C-terminal é suficiente para ativar o complexo, dispensando-se a necessidade de fosforilação da hélice T. Do ponto de vista da sequência de aminoácidos, as subunidades reguladoras da CDK5 não podem ser equiparadas às ciclinas devido à ausência de homologia sequencial. Contudo, através de previsões computacionais e cristalografia de Raio X demonstrou-se a capacidade desses péptidos de adotar conformações espaciais na interface de ligação à subunidade catalítica semelhantes às das ciclinas e da bolsa de ligação das ciclinas, facto que explica a ativação da CDK5 por determinadas ciclinas ^{25,32,43,79}.

Relativamente à localização espacial da CDK5, esta proteína é expressa no SNC em níveis comparativamente muito elevados, ainda que se distribua também por outros tecidos não neuronais. Porém, não havendo informação acerca da sua função e ativação em tecidos extra-neuronais, pensa-se que a sua atividade fundamental se restringe ao SNC devido à especificidade neuronal dos seus ativadores p35 e p39 ⁴³. No interior da

célula, a localização da CDK5 é igualmente diferente das restantes CDK pois, enquanto estas se situam predominantemente no núcleo onde participam ativamente no processo de divisão celular, a CDK5 ocupa uma posição essencialmente periférica no citosol devido à miristoilação da glicina N-terminal nos péptidos p35 e p39, com os quais deve complexar para se tornar ativa⁸⁰. Como tal, tendo em conta a sua localização periférica, assume-se que em condições normais a CDK5 fosforila substratos localizados também em regiões perimembranares. Por outro lado, é importante notar que as concentrações de CDK nos neurónios diferem das concentrações de p35 e p39, havendo um excesso de CDK5 livre que é solúvel quando presente no estado dissociado. A atividade da CDK, porém, depende dos níveis de p35 e p39 presentes, sendo que a regulação destes níveis é efetuada pela própria CDK5 mediante fosforilação de determinados resíduos, Ser8 e Thr138 no caso de p35²⁵. Esta fosforilação promove a degradação dos péptidos pela via ubiquitina-proteossoma, comumente utilizada na degradação de proteínas de baixa semivida, visto que a p35 e p39 possuem tempos de semivida de aproximadamente 30 e 120 minutos, respetivamente^{32,78-81}. Desconhecem-se as funções exatas destes péptidos reguladores, mas pensa-se que possuem capacidades compensatórias das funções individuais, reciprocamente. Todavia, estudos em ratinhos demonstram uma relevância superior da p35, na medida em que a sua ausência resulta em alguns defeitos neuronais, nomeadamente na laminação cortical e na fasciculação das fibras axonais, enquanto que na ausência de p39 não foi possível detetar quaisquer defeitos estruturais ou funcionais. A ausência de ambas, porém, traduz-se num efeito semelhante ao que ocorre na ausência da CDK5⁸².

2.2.1.2. P25

Patrick *et al.* debruçaram-se sobre o estudo da CDK5 na DA e, perante os resultados obtidos, verificaram que nos cérebros de doentes com DA ocorriam diversos fenómenos curiosos: enquanto os níveis de CDK5 e p35 se mantinham relativamente constantes, observava-se uma acumulação de um péptido com um peso molecular de cerca de 25kDa. Esse péptido apresentava homologia estrutural significativa relativamente a p35, uma vez que era reconhecido pela maioria dos anticorpos

específicos para este péptido, com exceção dos que reconheciam a região amino-terminal. Posteriormente, com base nas observações e em estudos complementares, o péptido foi identificado como sendo a proteína p25, previamente descrita e purificada por outros autores ⁸⁰.

Contrariamente ao que sucede com a p35, a distribuição cerebral da p25 correlaciona-se com as regiões onde predominam os agregados de tau hiperfosforilada, embora existam registos de uma maior distribuição por outras regiões isentas de NFT, o que leva a crer que a proteína p25 se acumula numa fase anterior à formação das NFT e desempenha um papel fulcral nesse processo. Adicionalmente à sua acumulação nos cérebros de doentes com DA, o tempo de semivida deste ativador é cerca de 5 a 10 vezes superior ao da respetiva forma não truncada p35, resultante da ausência de uma sequência reconhecida pelo complexo ubiquitina-proteossoma, o que lhe permite estabelecer um contacto mais prolongado com a CDK5, quer devido ao aumento do número de complexos CDK5-p25, quer devido a uma disponibilidade temporal superior para ligação, o que se traduz numa sobreativação da cinase. Adicionalmente, a força de ligação p25-CDK5 é superior à p35-CDK5 ^{80,83,84}.

Estruturalmente a p25 corresponde a uma forma truncada da p35, que resulta de clivagem proteolítica na região N-terminal, com formação do péptido p10, ancorado à membrana por meio da sequência de miristoilação, e do péptido p25, que permanece livre no citoplasma. Contrariamente ao seu precursor, a distribuição livre e ubiquitária do p25 pelo citoplasma confere-lhe a capacidade de alterar a especificidade da subunidade catalítica CDK, permitindo ao complexo fosforilar um leque mais extenso de substratos, para além dos que fosforila fisiologicamente quando ancorado à membrana. Consequentemente, há uma disrupção no balanço de moléculas fosforiladas e nos níveis de fosforilação, resultando em problemas neurológicos, como a Doença de Alzheimer ^{78,80}.

2.2.1.3. CDK5-p25 e a Doença de Alzheimer

Em determinadas situações neurotóxicas, nomeadamente stress oxidativo, excitotoxicidade, contacto com a proteína beta-amilóide e influxo excessivo de cálcio, ocorre a ativação de uma família de proteases cisteínicas dependentes de cálcio,

designadas por calpaínas. As calpaínas são proteases essenciais para o funcionamento normal do SNC. Porém, perante neurotoxicidade, passam a desempenhar um papel central no processo neurodegenerativo³⁷. O ambiente neurotóxico gerado pela patologia da doença de Alzheimer favorece a ativação desta família de proteases, cuja função no presente contexto se prende com a clivagem proteolítica da p35, dando origem à p25 no citosol neuronal. Posteriormente, um péptido com uma semivida superior, deslocalização citosólica e nuclear e acumulação resultante da ineficiência de degradação pelo proteossoma, estabelece uma interação mais forte e prolongada com a CDK5, ativando-a de forma constitutiva⁸⁴.

A proteína tau é um dos substratos fisiológicos da CDK5. Porém, a sobreativação da cinase pela p25 traduz-se numa fosforilação excessiva da tau, afetando múltiplos epítomos tipicamente fosforilados na DA, como Ser202, Thr205, Ser235, e Ser404, segundo resultados obtidos utilizando anticorpos específicos para a fosfo-tau da DA. O mecanismo exato que conduz à hiperfosforilação da tau pela CDK5 não está esclarecido, mas pensa-se envolver diversos fatores adicionais à sobreatividade da própria CDK, de entre os quais a ativação de outras cinases que demonstraram estar envolvidas na fosforilação, como a GSK-3 β ²⁵.

Para além da tau, a CDK5 desempenha um papel importante na origem da outra proteína essencial na DA, a beta-amilóide, pois estimula a sua produção e acumulação, participando na neuropatologia subsequente que culmina com a morte neuronal. Pensa-se que essa ativação resulta da fosforilação da proteína precursora da amilóide no resíduo de treonina Thr668, favorecendo a via amiloidogénica^{25,85}.

2.3. Âmbito do trabalho

Considerando os prejuízos económicos e sociais associados à doença de Alzheimer e a ausência de opções terapêuticas que permitam atuar na fisiopatologia desta demência é imperativo investir na investigação e desenvolvimento neste campo para oferecer novas alternativas aos indivíduos afetados.

No contexto do desenho de fármacos para controlo da DA, a atuação ao nível dos fenómenos responsáveis pela patologia é a abordagem mais eficaz. Na seleção de

alvos terapêuticos considera-se frequentemente a CDK5, pois esta cinase está identificada como um intermediário essencial no aparecimento e progressão dos sintomas associados à neurodegeneração. Nomeadamente, o complexo CDK5-p25 é um alvo terapêutico de eleição na terapêutica da DA, pois considera-se que a sua inibição impede a progressão da doença. Para além disso, o aumento anormal da conversão do péptido p35 em p25 na DA, a deslocalização da p25 e a sobreativação da CDK5 permitem que a inibição do complexo CDK5-p25 não se traduza em repercussões severas nos processos fisiológicos celulares.

Como estratégia para este trabalho, pensou-se inicialmente na inibição do péptido p25, de forma a impedir a estimulação aberrante da CDK5 mediante a formação do complexo CDK5-p25. Porém, dada a escassez da informação respeitante ao péptido p25, e tendo em conta que foi demonstrada uma atividade endógena da p25 no processo de formação⁸⁶ e extinção da memória⁸⁷, optou-se por uma abordagem que envolva a inibição seletiva do complexo hiperativo gerado em situações neurotóxicas, CDK5-p25, permitindo que os complexos fisiológicos se mantenham e possam exercer a sua função normal, garantindo a fosforilação de todos os substratos fisiológicos da cinase.

Por conseguinte, no âmbito desta monografia, para contornar os problemas associados à ineficácia terapêutica dos grupos farmacológicos atualmente utilizados na Doença de Alzheimer e proporcionar possíveis respostas terapêuticas modificadoras do processo de hiperfosforilação da tau, propõe-se a síntese de potenciais inibidores do complexo CDK5-p25, com o intuito de serem submetidos a posterior avaliação *in vitro* em culturas primárias de neurónios corticais de ratinhos *Mus musculus*. A existência de uma estrutura cristalográfica do complexo⁸⁴ e de informação prévia relativa a algumas moléculas que interagem com este alvo^{88,89} e exibem atividade a este nível permitiram a seleção de um quimiotipo de compostos potencialmente ativos no alvo estabelecido.

De acordo com informação recolhida da literatura^{90,91}, alguns compostos de base quinolílica reúnem características estruturais que favorecem a sua interação com o sítio ativo pretendido, permitindo o desenho e a síntese de um leque de estruturas potencialmente inibidoras do complexo. Procedeu-se também à avaliação de fármacos de base quinolílica disponíveis, estruturalmente semelhantes e que se considerou poderem interagir com o alvo. Propõe-se, portanto, numa perspectiva de “drug

repurposing”, a avaliação de fármacos antimaláricos dotados de características estruturais e propriedades farmacológicas tidas como promissoras para interação com o complexo CDK5-p25, com o intuito de determinar a sua potencial utilização na inibição de uma das principais cinases responsáveis pela fosforilação da tau e consequente impedimento da neurodegeneração e morte neuronal.

Página intencionalmente deixada em branco

III. QUINOLINAS

3.1. Fundamento teórico

As moléculas com núcleo quinolínico representam uma classe de compostos heterocíclicos fundamental em Química Farmacêutica, pelo elevado potencial terapêutico que detêm. Os compostos bioativos de base quinolínica, alguns obtidos a partir de uma variedade de produtos naturais e outros por processos de síntese química ou por via biotecnológica, e posteriormente otimizados por semi-síntese, estão associados a diversas atividades farmacológicas, nomeadamente: antivírica^{92,93}, anticancerígena⁹⁴, antibacteriana⁹⁵⁻⁹⁷, antiparasitária⁹⁸⁻¹⁰⁰, anti-inflamatória¹⁰¹, antifúngica¹⁰², antipsicótica¹⁰³, regulação metabólica¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, analgésica^{107,108}, anti-isquêmica¹⁰⁹ e neuroprotetora^{90,110}. Porém, apesar do leque de atividades terapêuticas já demonstradas, a aplicação de quinolinas no tratamento de doenças neurodegenerativas tem sido muito pouco explorada.

O presente capítulo apresenta informação sobre a relevância farmacológica das quinolinas, desde a primeira utilização terapêutica de compostos deste quimiotipo até às diferentes funções que exercem em patologias humanas, razão pela qual são frequentemente designadas por “quimiótipo de excelência”. É justificada a escolha desta classe para o desenvolvimento de fármacos para a doença de Alzheimer com base nas suas características estruturais favoráveis para utilização para este fim. São também apresentadas diversas metodologias de síntese para a obtenção do núcleo quinolínico e, por fim, é feita uma descrição detalhada do método de síntese escolhido no trabalho experimental que se inclui nesta monografia.

A estrutura quinolínica, representada pela fórmula molecular C_9H_7N , caracteriza-se por um sistema heteroaromático contendo pelo menos um átomo de azoto na posição 1 do anel e até um total de quatro átomos de azoto na estrutura central, fundido com outro anel aromáticos que pode ser carbocíclico ou heterocíclico¹¹¹.

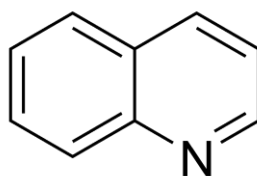


Figura III-1. Representação da estrutura quinolínica.

O primeiro registo da utilização deste quimiótipo em patologias humanas provém do século XVII, mais propriamente da lenda sobre a condessa Anna del Chinchon, que ficou curada de malária após ingestão de um remédio obtido a partir da casca de árvore *Cinchona officinalis* uma espécie da família das *Rubiaceae* com origem na América do Sul, designado por **quinino (1;** Figura III-2)¹¹². Embora existam várias espécies de árvores cinchona, a casca proveniente de qualquer uma das espécies comprovou conter uma mistura de alcaloides em quantidades variáveis, dos quais o quinino era um dos componentes principais. Este composto foi posteriormente extraído com êxito dessa mistura de alcaloides, em 1820, por dois cientistas franceses, Pelletier e Caventou ¹¹³, e passou a ser utilizado em monoterapia para o tratamento da febre intermitente, denominação então empregue para a malária. O isolamento do quinino e a atividade significativa que revelou contra a fase eritrocítica da malária conduziu a uma sobreutilização, evidenciando a escassez dos recursos disponíveis para extração deste fármaco em muitos territórios. Conseqüentemente, a necessidade premente de terapêuticas antimaláricas estimulou o investimento na síntese química deste agente.¹¹⁴ O primeiro composto antimalárico sintético, obtido na tentativa de síntese do quinino foi o **azul de metileno** que, por sua vez, constituiu o primeiro fármaco de origem sintética a ser utilizado em seres humanos ^{112,115}. Com base no processo de síntese do azul de metileno, surgiu a primeira molécula com núcleo quinolínico, a **plasmaquina**, ativa contra a fase hepática da infecção e contra reinfeções por *P. vivax*. Modificações sistemáticas a nível do anel quinolínico conduziram à obtenção de uma biblioteca de derivados, entre os quais a **cloroquina (2;** Figura III-2), uma 4-aminoquinolina clorada na posição 7 do anel ¹¹⁶. Esta molécula, embora ignorada inicialmente pela sua elevada toxicidade, revolucionou a terapia da malária pois demonstrou ser o fármaco com maior eficácia na fase eritrocítica e com maior tolerabilidade, de entre os fármacos desenvolvidos até então, passando a ser usada no tratamento e na profilaxia da malária, independentemente da espécie do parasita ¹¹⁷. Contudo, o seu uso irracional, na tentativa de erradicar a malária ao longo das décadas seguintes, desencadeou o desenvolvimento de resistência por parte do parasita, gerando a necessidade de se investir em novos fármacos. Ainda assim, a cloroquina continua a ser utilizada em

determinadas regiões geográficas, numa abordagem preventiva ou curativa, perante espécies de *Plasmodium* sensíveis, em combinação com outros fármacos ^{116,118}.

Os sucessores quinolínicos da cloroquina substituídos na posição 4 incluem a **amodiaquina (3)**; Figura III-2) e a **mefloquina (4)**; Figura III-2), que comprovaram atividade em espécies do parasita resistentes à cloroquina. Porém, a verificação de resistência cruzada entre a amodiaquina e a cloroquina, assim como a prevalência de toxicidade elevada associada à mefloquina, limitam o uso destes compostos na terapêutica da malária nos dias de hoje ¹¹⁹. Não obstante, embora a utilização de quinolinas inspiradas no quinino seja reduzida para o fim ao qual se destinaram inicialmente, representam uma classe promissora para “*drug repurposing*” em outras doenças, nomeadamente na Doença de Alzheimer, pelas características favoráveis que exibem para interação com o alvo terapêutico escolhido no âmbito do presente trabalho, o complexo CDK5-p25.

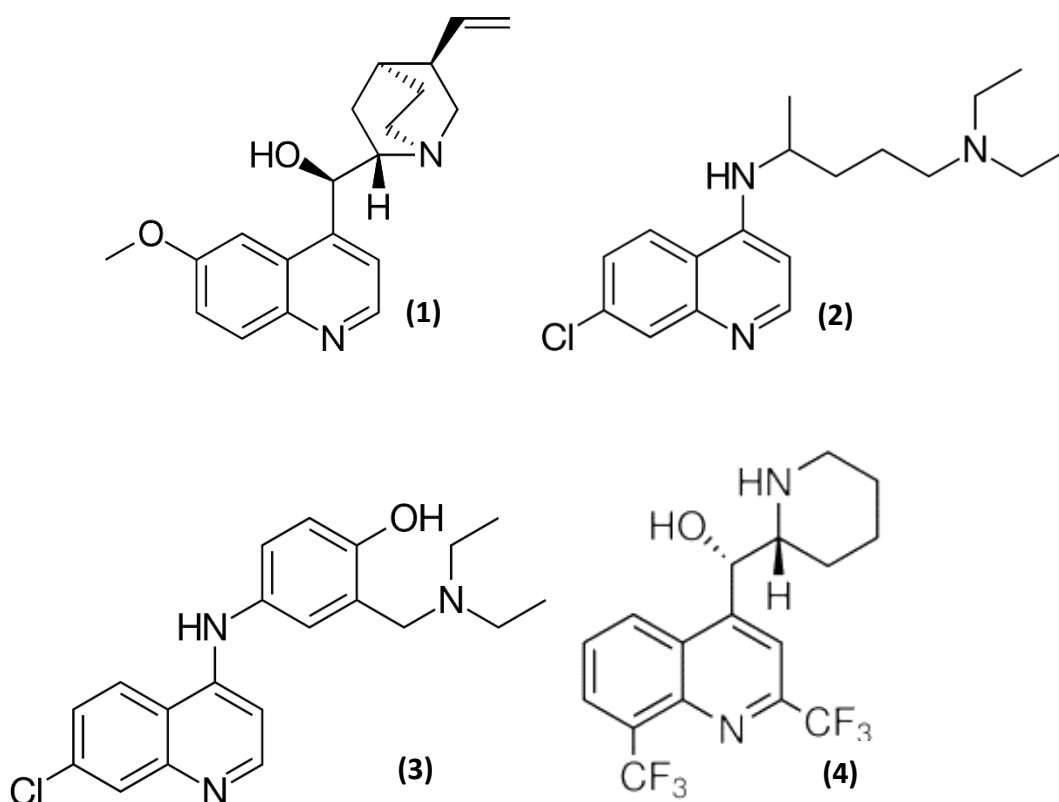


Figura III-2. Representação da estrutura química do quinino (1) e dos seus derivados cloroquina (2), amodiaquina (3) e mefloquina (4).

3.1.1. Quinolinas na Doença de Alzheimer

A versatilidade dos derivados de quinolina, demonstrada ao longo das últimas décadas, impulsionou a investigação do potencial desta classe no controlo de diversos processos patológicos da doença de Alzheimer, nomeadamente na modulação da agregação proteica da beta amiloide¹²⁰, na inibição da expressão e da ação das presenilinas¹²¹ e de outras proteínas intervenientes na produção de A β como a beta-secretase¹²², na inibição da ligação de NMDA nos recetores de glicina¹²³, na antagonização de recetores 5-HT¹²⁴, na neutralização da toxicidade mediada pelas formas oligoméricas solúveis de A β ¹²⁵, na inibição de cinases essenciais no processo de hiperfosforilação da tau, nomeadamente a GSK-3 β ¹²⁶ e a CDK5-p25^{90,91}, e enquanto agente multifuncional, atuando em diversos alvos^{127,128}.

Zhong *et al.* introduziram um estudo pioneiro que se pretende desenvolver no âmbito desta monografia.⁹¹ Dada a homologia estrutural entre a CDK2 e a CDK5, este grupo baseou-se na estrutura de compostos contendo um grupo ureia e o complexo cristalográfico estabelecido com o alvo CDK2 para desenvolver análogos quinolínicos adaptados ao sítio de ligação, neste caso, da cinase homóloga CDK5. Sabe-se que o sítio de ligação da CDK5 difere do sítio de ligação da CDK2 em apenas dois aminoácidos (Cys83 e Asp84 da CDK5 correspondem a Leu83 e His84 na CDK2)⁹⁰, pelo que facilmente se consegue fazer a extrapolação de resultados na CDK2 para a CDK5. Esta característica, embora seja positiva, na medida em que permite que ligandos da CDK2 sejam modificados para interagir com a CDK5, constitui um dos problemas associados aos inibidores da CDK5 no que toca à seletividade dos compostos para o alvo pretendido, verificando-se frequentemente promiscuidade dos ligandos para a CDK2.

Chatterjee *et al.*⁹⁰ debruçaram-se sobre o desenho e desenvolvimento de derivados quinolínicos seletivos para a CDK5, utilizando compostos estruturalmente similares aos propostos pelo grupo anterior, embora através de uma abordagem diferente, o que comprova a efetividade do quimiotipo quinolínico enquanto líder promissor para interação com o complexo CDK5-p25. Ao avaliarem o sítio ativo do alvo e as interações que diferentes inibidores do complexo CDK5-p25 estabelecem com o mesmo nas respetivas estruturas cristalográficas, desenharam um farmacóforo que

permitisse fazer uma seleção virtual de potenciais ligandos ativos no sítio de ligação do alvo.

Alguns dos inibidores conhecidos da CDK5-p25 são a roscovitina, a aloisina A, a indirubina-3-monoxima e o diaminotiazole (1UNL, 1UNG, 1UNH e 3O0G, respectivamente, na base de dados *Protein Data Bank*, vidé **VIII. Anexos**), e todos interagem com o sítio de ligação do ATP^{129,130}. Esta bolsa de ligação contém 21 resíduos disponíveis para participar na interação com os ligandos, nomeadamente Ile10, Gly11, Glu12, Gly13, Thr14, Val18, Ala31, Val64, Phe80, Glu81, Phe82, Cys83, Asp84, Asp86, Lys89, Lys128, Gln130, Asn131, Leu133, Ala143, e Asp144¹³¹. O estudo das estruturas cristalográficas dos complexos formados pela cinase com os inibidores supracitados, conjuntamente com os modelos farmacofóricos virtuais obtidos utilizando programas próprios, permitiu identificar uma série de propriedades farmacofóricas presentes em cada estrutura, relevantes para a posterior fase da seleção dos candidatos mais aptos para interagir com o sítio-ativo em questão (vidé Figura III-3).

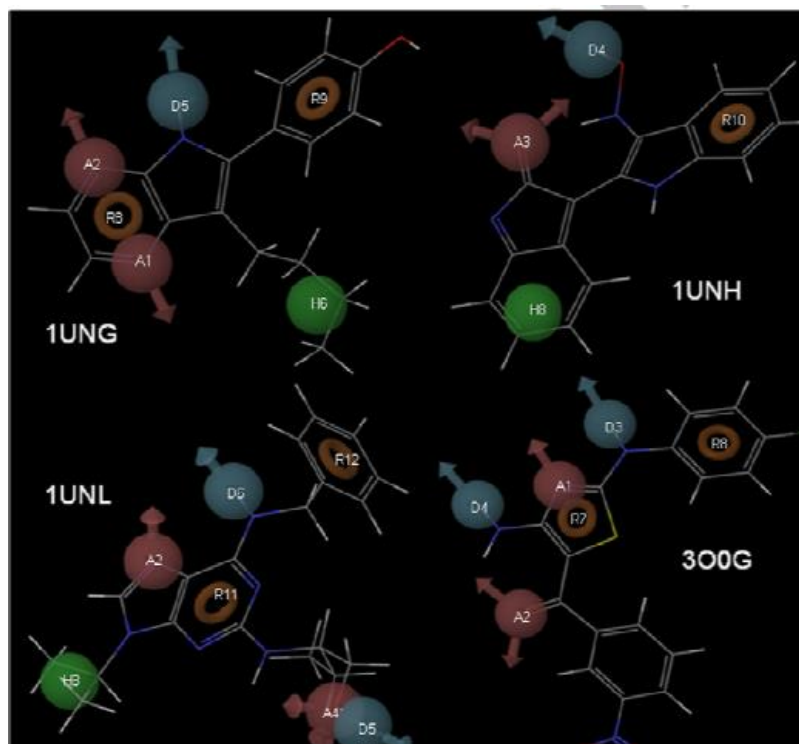


Figura III-3. Representação dos modelos farmacofóricos virtuais estabelecidos para os inibidores conhecidos do complexo CDK5-p25: roscovitina, aloisina A, indirubina-3-

monoxima e diaminotiazole (1UNL, 1UNG, 1UNH e 300G, respetivamente) (*Adaptado de* ⁹⁰).

Após a seleção de um líder de série, modificações estruturais nesse composto geraram uma biblioteca de análogos estruturais, que foram submetidos a ensaios biológicos para comprovar a sua eficácia.

Da análise das estruturas propostas pelos dois grupos^{90,91} verificou-se a existência de dois modos de interação possíveis entre os compostos quinolínicos e o sítio de ligação do ATP no complexo CDK5-p25, ambos resultando em afinidades elevadas e valores de IC₅₀ baixos. Zhong propõe compostos com IC₅₀'s na gama nM, dotados das seguintes características estruturais:

1. Presença do núcleo quinolínico, formado pelos anéis fundidos com aromaticidade, que permite estabelecer interações, através da nuvem electrónica π , com a região central da bolsa de ligação;
2. Presença da amina gerada a partir do azoto quinolínico que permite a interação com o resíduo Cys83 através de uma ponte de hidrogénio, atuando como dador de pontes de hidrogénio;
3. A introdução de um carbonilo ou substituinte análogo aceitador de pontes de hidrogénio em C-2, que resulta numa interação mais forte com o resíduo de cisteína Cys83, por permitir a possibilidade de formar duas pontes de hidrogénio com esse aminoácido;
4. A introdução em C-3 de um espaçador ligado a um anel aromático substituído na posição 4 com grupos aceitadores de pontes de hidrogénio, que medeia a interação desse sistema de anel com uma bolsa profunda próxima de uma região hidrofílica e a interação por ponte de hidrogénio do substituinte em C-4 com a ponte salina Lys33-Asp144;
5. A possibilidade de inserção de um átomo de enxofre no espaçador, que resulta numa interação mais forte;
6. A possibilidade de introdução de substituintes amina na posição 4, que são bem tolerados, e de substituições diversas na posição 7, sendo que se trata da posição que permite maior flexibilidade para introdução de grupos substituintes neste modelo farmacofórico ⁹¹.

Segundo o modelo proposto por Chatterjee⁹⁰, as características estruturais mais importantes dos candidatos, que, por sua vez, demonstraram uma seletividade comprovada computacionalmente para a CDK5-p25, em detrimento da CDK2 e de outras cinases da tau, assim como uma inibição não-competitiva com o ATP pela bolsa de ligação, enumeram-se de seguida:

- a) Presença de anéis aromáticos no núcleo quinolínico que possibilita a interação por intermédio de interações π com a região central da bolsa;
- b) Presença da amina em N-1 que gera a possibilidade de interação por ponte de hidrogénio com o resíduo Asp144 numa bolsa profunda, conferindo a capacidade de inibição não-competitiva com o ATP;
- c) Possibilidade de introdução de um substituinte carbonilo ou outro grupo aceitador de ponte de hidrogénio para interagir com a amina do resíduo Asp144 e conseqüente fortalecimento da interação nessa posição;
- d) A introdução de um espaçador em C-3 ou C-4, preferencialmente de um sistema rígido, seguido de uma amina e um grupo aromático substituído em posição *orto* com grupos aceitadores de pontes de H, que permite a interação com o Asp86 por pontes de hidrogénio e a acomodação do grupo aromático numa bolsa profunda importante na formação de interações aromáticas, característica responsável pela seletividade para a CDK5⁹⁰.

Na ausência do substituinte aromático da cadeia lateral dos derivados propostos por Chatterjee, verificou-se que os compostos adotam um modo de interação com o sítio-ativo equivalente ao proposto pelo grupo de Zhong. Estas evidências realçam a versatilidade da classe quinolínica, enfatizando não só a sua capacidade de estabelecer interações favoráveis com múltiplos alvos como também a capacidade para interagir com o mesmo alvo de modos distintos, resultando em capacidades inibitórias substanciais, em dinâmicas de interação díspares. Adicionalmente, a utilização de compostos do tipo quinolínico apresenta um arsenal de vantagens complementares, nomeadamente relativa facilidade de síntese, boas características farmacocinéticas e propriedades físico-químicas favoráveis, como fraca interação com as proteínas plasmáticas e boa capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica, tornando-as

uma classe de eleição para estudos e investigação mais aprofundados em química medicinal ¹³².

3.1.1.1. Antimaláricos com estrutura quinolínica enquanto candidatos para “*drug repurposing*” na DA

Os compostos antimaláricos selecionados para avaliação no âmbito do presente trabalho são o quinino, a cloroquina e a amodiaquina. Embora a sua utilização no tratamento da malária seja reduzida atualmente, por perda de eficácia devido ao alastramento de estirpes de *Plasmodium* resistentes, estas moléculas comportam inúmeras propriedades benéficas que justificam a contínua investigação desta classe, nomeadamente um método de síntese otimizado, assim como perfis de segurança previamente estabelecidos, associados a uma elevada tolerabilidade e baixa incidência de reações adversas ¹¹⁷.

Com base nos requisitos estruturais necessários para interação com o complexo CDK5-p25, determinados pelos dois grupos, com base em estudos *in silico* e na análise das interações estabelecidas com os inibidores roscovitina, indirubina-3-monoxima, aloisina A e diaminotiazole, baseada em estudos cristalográficos, e acima descritos, percebeu-se que os antimaláricos propostos reúnem propriedades estruturais favoráveis para interação com o alvo.

O resíduo Cys83 foi definido por Wu *et al.* como sendo o mais importante para a energia de ligação, na bolsa de ligação, pela força que resulta das suas pontes de hidrogénio com os ligandos. Seguidamente, os resíduos Glu81 e Ala10 contribuem também de forma significativa para a energia de ligação através de interações por pontes de H, assim como os resíduos Leu133 e Phe82, cuja contribuição substancial resulta de interações de Van der Waals protagonizados pelos resíduos hidrofóbicos¹²⁹. Os antimaláricos de base quinolínica selecionados apresentam fortes probabilidades de interagir pelo menos com alguns destes resíduos, sendo as hipóteses formuladas para as possíveis interações descritas abaixo.

a. Quinino:

- 1- O anel aromático do núcleo quinolínico permite estabelecer interações π com a bolsa de ligação;
- 2- O azoto da posição 1 apresenta características favoráveis para interação com a função amina do resíduo Cys83;
- 3- O azoto do sistema quinuclidina apresenta-se posicionado próximo do resíduo de Lys33, sendo possível a interação por ponte de H;
- 4- O anel quinolínico apresenta características estruturais favoráveis para formar interações de Van der Waals com os resíduos Leu133 e Ala31.

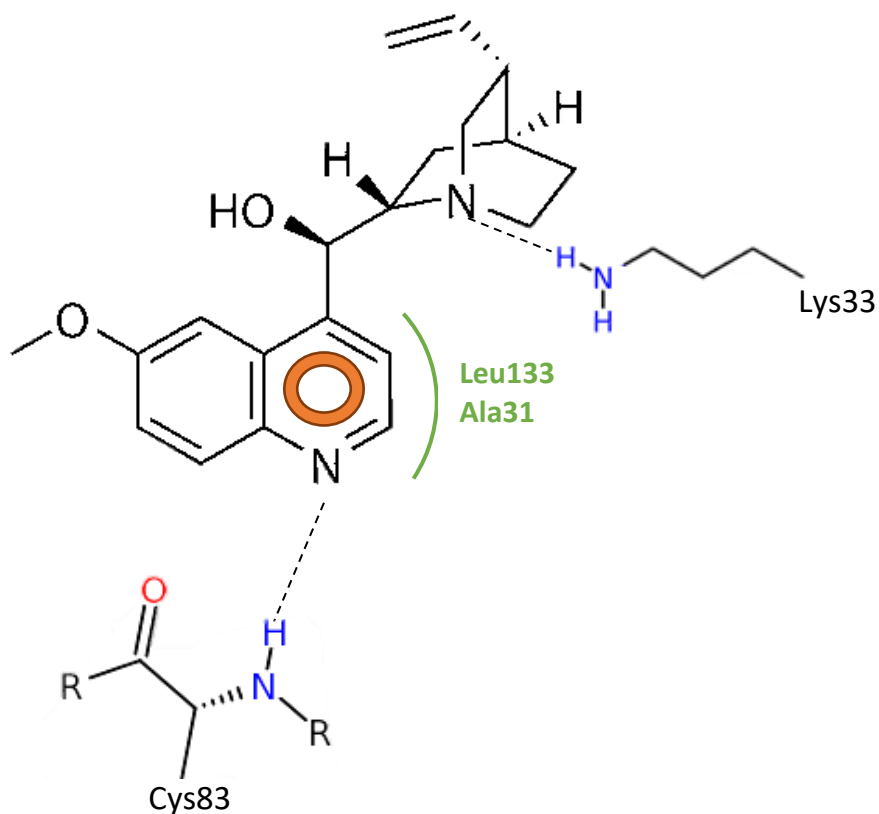


Figura III-4. Representação ilustrativa das interações hipotéticas esperadas entre o quinino e o sítio de ligação do ATP no complexo CDK5-p25.

b. Cloroquina:

- 1- O anel aromático do núcleo quinolínico possibilita interações π com a região central da bolsa;
- 2- O azoto da posição 1 permite a interação com a amina doadora de pontes de H do resíduo Cys83;
- 3- O cloro da posição 7 pode formar uma interação favorável com a bolsa formada pelo resíduo Ile10, que permite acomodar diversos substituintes nessa posição;
- 4- O grupo dipropilamina da cadeia lateral, embora não seja cíclico, apresenta características favoráveis para interagir com a bolsa profunda próxima da ponte salina Lys33-Asp144, com a possibilidade de estabelecimento de uma ponte de hidrogénio entre o azoto do substituinte e a amina da Lys33.

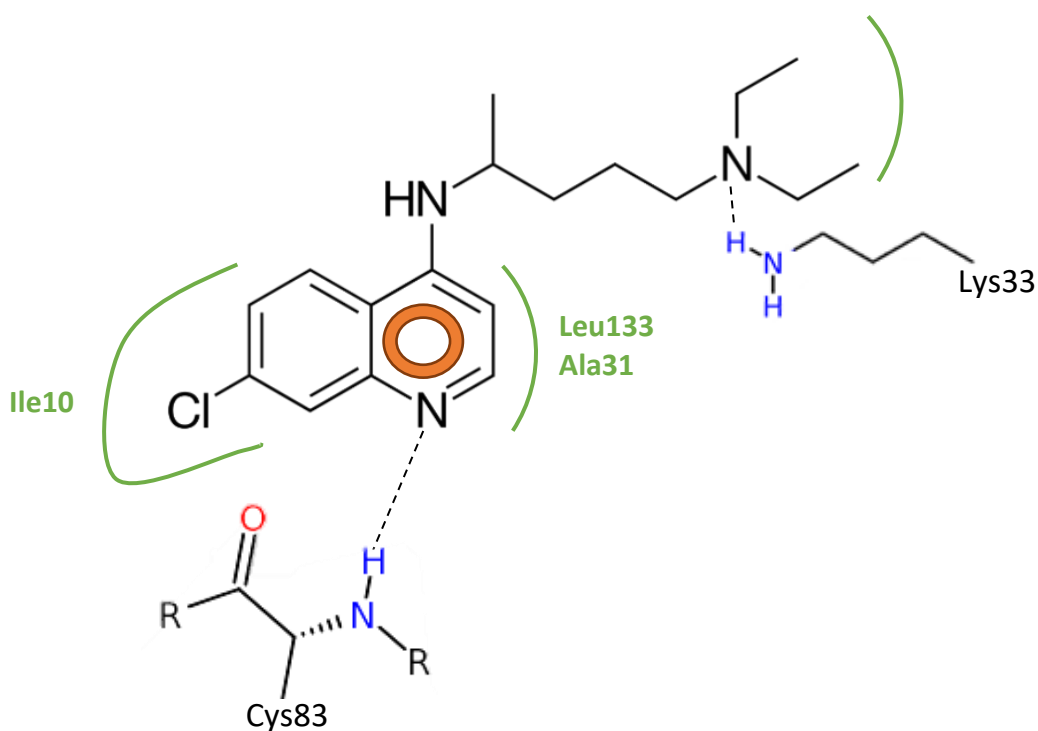


Figura III-5. Representação ilustrativa das interações hipotéticas esperadas entre a cloroquina e o sítio de ligação do ATP no complexo CDK5-p25.

c. Amodiaquina:

A amodiaquina apresenta propriedades favoráveis para interagir com o alvo, segundo o modelo proposto por Chatterjee (Ver esquema representativo na Figura III-6):

- 1- O azoto da posição 1, pelo seu carácter aceitador de pontes de hidrogénio, permite a interação com a amina doadora de pontes de H do resíduo Asp144, responsável pela inibição não-competitiva com o ATP;
- 2- O anel aromático adjacente à amina em C-4 confere rigidez e comprimento ao espaçador, de modo a possibilitar a interação do grupo trietilamina com a bolsa profunda, por forças de Van der Waals;
- 3- Simultaneamente, o azoto do substituinte trietilamina é um bom candidato para interagir com o resíduo Asp86 da bolsa profunda, possibilitando a inibição seletiva da CDK5;
- 4- O duplo anel central, dada a importância para a atividade que demonstrou nos estudos suprarreferidos, exhibe a possibilidade de interação por forças aromáticas ou de Van der Waals com os resíduos situados nessa região.

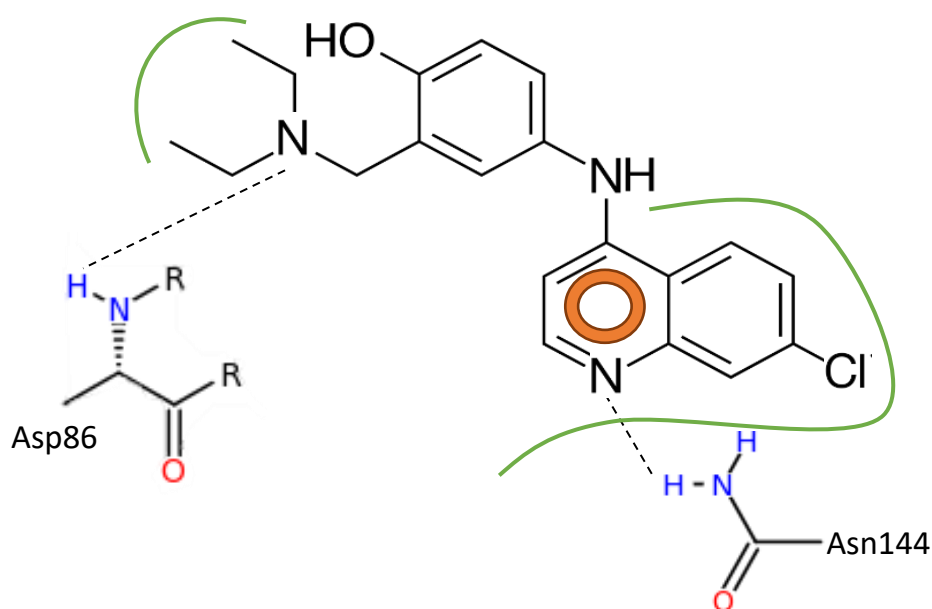


Figura III-6. Representação ilustrativa das interações hipotéticas esperadas entre a amodiaquina e o sítio de ligação do ATP no complexo CDK5-p25.

3.2. Métodos de síntese

As metodologias de síntese de quinolinas são muito variadas, sendo que a maioria corresponde a modificações do método original introduzido por Zdenko Hans Skraup, em 1880, baseado numa mistura reacional contendo anilina, glicerol, ácido sulfúrico e um agente oxidante, aquecida a altas temperaturas durante longos períodos de tempo (Figura III-7) ^{133,134}. Este método permite a obtenção do núcleo quinolínico isento de substituintes.

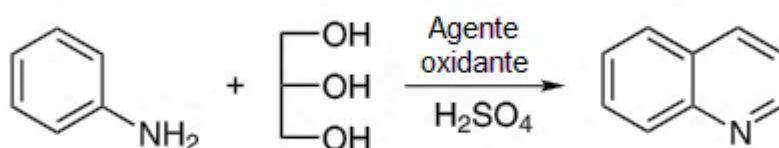


Figura III-7. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Skraup (*Adaptado de* ¹³⁵).

O mecanismo exato de reação para obtenção do produto segundo o método de Skraup permanece desconhecido. Vários mecanismos foram propostos por diferentes autores, dos quais os dois abaixo representados mereceram mais aceitação para descrever a evolução da reação (Figura III-8). Ambas envolvem a obtenção de acroleína por reação do glicerol com o ácido sulfúrico, seguida de posterior ciclização resultante de acilação de Friedel-Crafts a altas temperaturas, originando o anel quinolínico ^{135,136}.

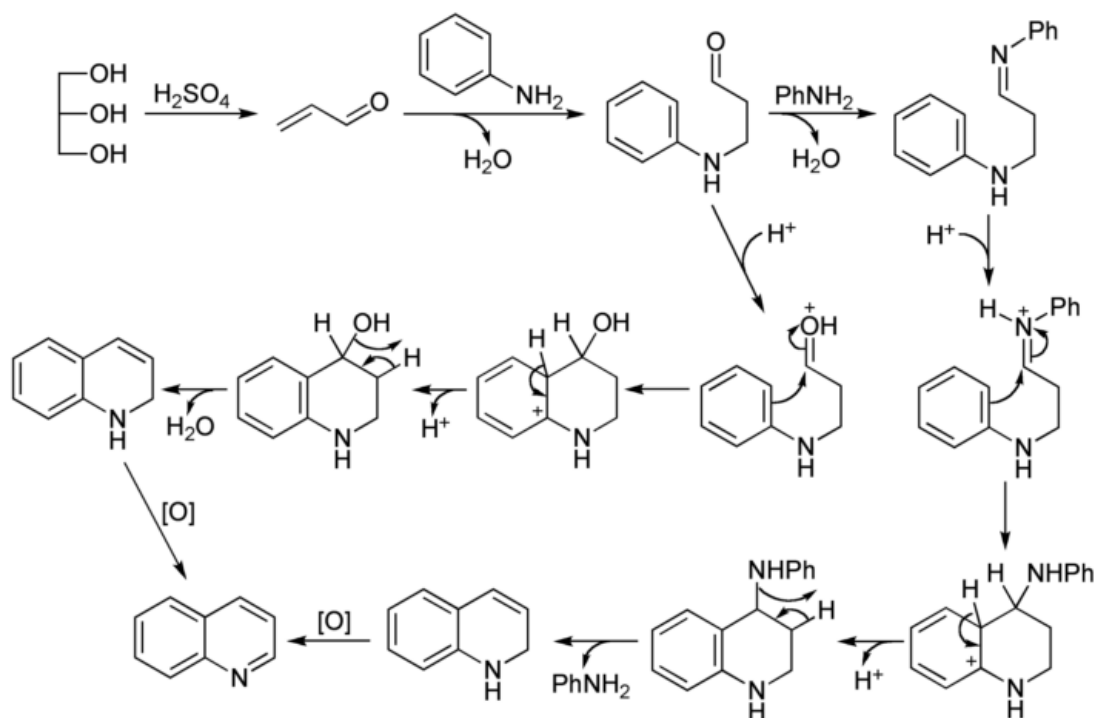


Figura III-8. Representação de duas vias para o mecanismo de reação da síntese de Skraup (Adaptado de¹³⁵).

Embora este método seja ainda utilizado para obter o anel quinolínico não-substituído, as desvantagens associadas ao mesmo, nomeadamente rendimentos baixos, difícil isolamento do produto, condições reacionais violentas e toxicidade dos reagentes, conduziram à necessidade de modificar o procedimento para permitir uma síntese mais eficaz. Outra limitação desta metodologia é o facto de não permitir variabilidade estrutural, pelo que houve necessidade de desenvolver metodologias para preparação de quinolinas substituídas.

A primeira modificação do método de Skraup foi introduzida por Doebner e Von Miller em 1881. Neste método, os autores propuseram a utilização de aldeídos ou cetonas α , β -insaturados (análogos da acroleína), em meio ácido, para reagir com a anilina (Figura III-9). Contrariamente ao anterior, este método permitiu a introdução de substituintes no anel piridínico¹³⁷.

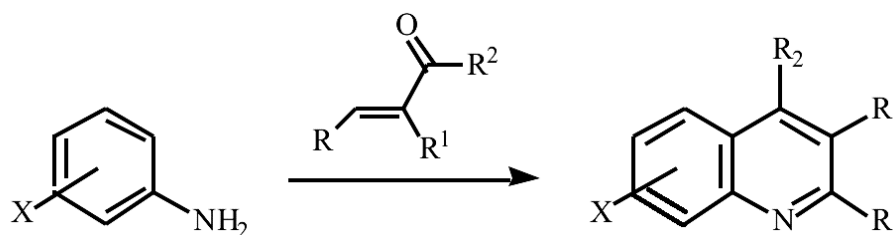


Figura III-9. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Skraup-Doebner-Von Miller (*Adaptado de*¹³⁸).

Ao método de Skraup-Doebner-Von Miller seguiu-se o método de Friedländer, introduzido em 1882. Esta reação consiste numa condensação entre uma *o*-cetoanilina e um composto carbonílico derivado do acetaldeído, na presença de hidróxido de sódio (Figura III-10) e difere dos métodos anteriores na medida em que permite que o fecho do anel não envolva um carbono do sistema aromático¹³⁹. A vantagem deste método prende-se com a possibilidade de introduzir variabilidade estrutural através de alterações nos substituintes em R, R' e R'', assim como no próprio anel benzénico.

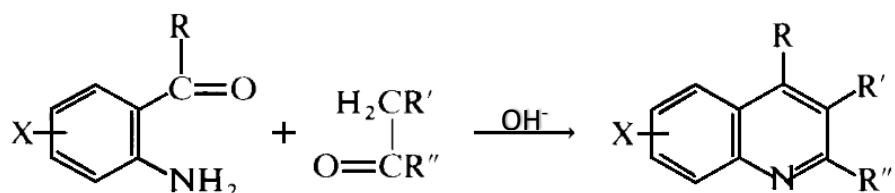


Figura III-10. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Friedländer (*Adaptado de*¹³⁹).

A reação de Pfitzinger, introduzida em 1886, corresponde a uma variante da reação de Friedländer, pois utiliza como composto de partida uma isatina ao invés de *o*-cetoanilina para reagir com propanona em meio básico (Figura III-11). Esta reação é considerada uma extensão da anterior uma vez que o meio básico promove a abertura da isatina, originando o ácido isático que sofre posterior condensação com a propanona para gerar a quinolina^{140,141}.

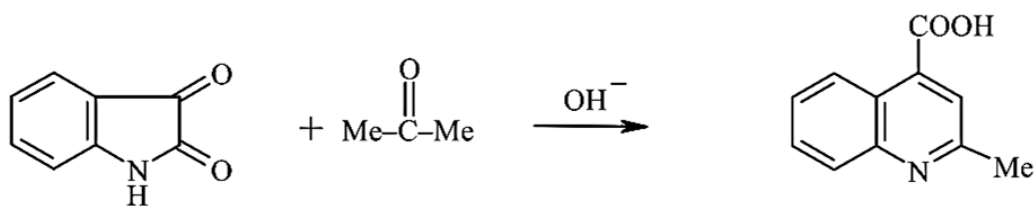


Figura III-11. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Pfitzinger (*Adaptado de*¹⁴¹).

Em 1887, Conrad e Limpach apresentaram uma nova variante da reação de Skraup que permite a obtenção de 4-oxoquinolinas ou quinolonas. Tal como Skraup, estes químicos empregaram uma anilina enquanto composto de partida, que foi submetida a acoplamento com um β -cetoéster, sob aquecimento ou catálise ácida, originando o núcleo 4-oxoquinolínico¹⁴².

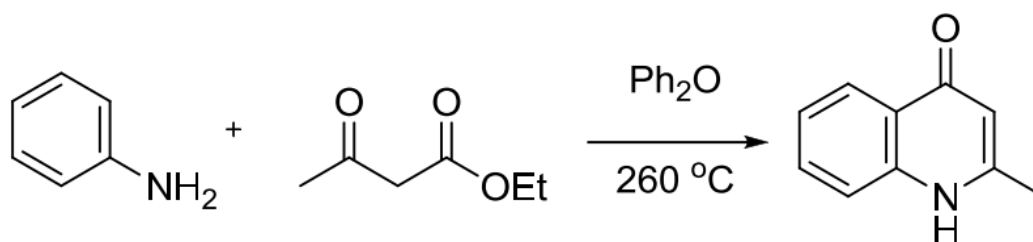


Figura III-12. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Conrad-Limpach (*Adaptado de*¹⁴²).

Combès propôs em 1888 uma estratégia de síntese de quinolinas, baseada na condensação de anilinas com compostos 1,3-dicarbonílicos. Esta estratégia bietápica envolve a formação inicial de enaminas, seguida da sua ciclização em meio ácido, originando as quinolinas correspondentes¹⁴³. Este método é muito semelhante ao de Conrad e Limpach, diferindo apenas na natureza do substituinte na posição 4, que deriva da cadeia lateral do composto dicetónico.

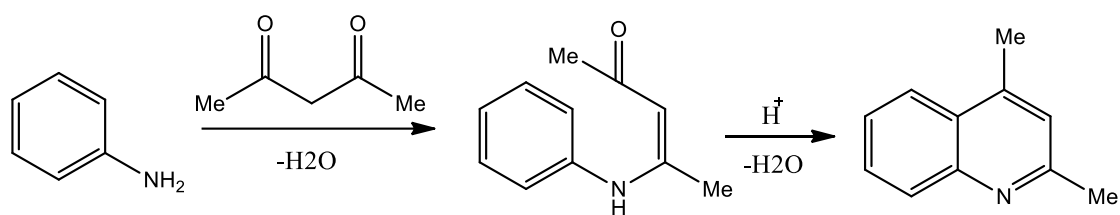


Figura III-13. Representação do esquema geral de síntese de quinolina segundo o método de Combès (*Adaptado de* ¹⁴³)

No século seguinte, em 1963, Povarov demonstrou a possibilidade de síntese de quinolinas substituídas em C-2, ou tetrahydroquinolinas, mediante uma reação de cicloadição entre N-ariliminas (dienos), obtidas a partir da reação de condensação prévia de uma anilina com um aldeído, e alcenos ativados (dienófilos), em meio ácido ¹⁴².

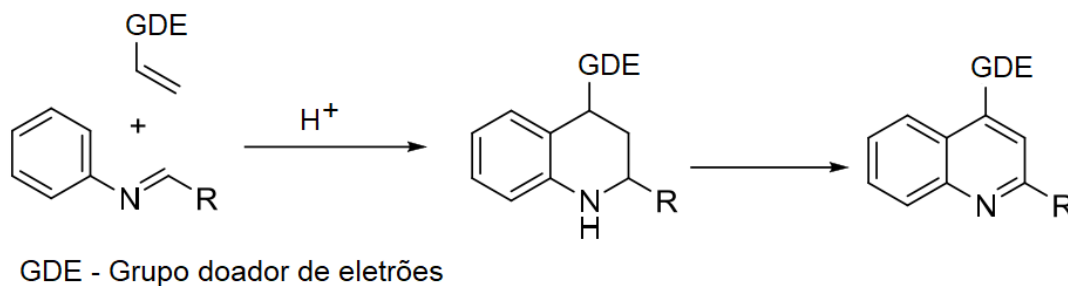


Figura III-14. Representação do esquema geral de síntese de quinolinas segundo o método de Povarov (*Adaptado de* ¹⁴²).

Trata-se de uma reação de Aza-Diels-Alder, posteriormente aperfeiçoada através de um esquema de síntese “one-pot” que permite gerar a N-arilimina *in situ*, para posterior condensação com o alceno ¹⁴⁴.

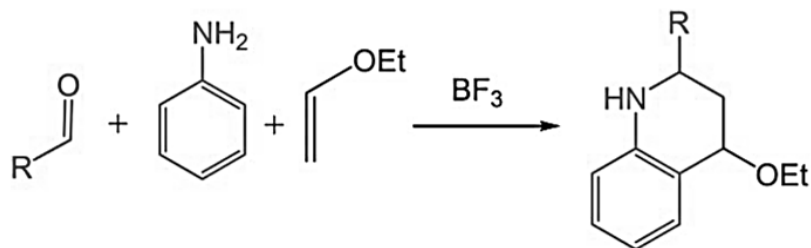


Figura III-15. Representação da reação de Povarov modificada (*Adaptado de* ¹⁴⁴).

Embora todas as estratégias clássicas de síntese de quinolinas permitam a obtenção de diversos derivados desta classe, as desvantagens associadas à sua utilização no que toca a reagentes, condições de reação e rendimentos continuaram a requerer aperfeiçoamento dos métodos preexistentes ou desenvolvimento de novas estratégias de síntese, para garantir uma maior eficiência nos processos. Recentemente foram introduzidos vários métodos alternativos que envolvem, nomeadamente, a catálise por complexos metálicos ¹⁴⁵, a ciclização eletrofílica, a ciclização oxidativa, a cascata de reações aza-Wittig, a ciclização promovida por radicais, a cicloadição de azadienos com alcinos internos, entre outros, para contornar os problemas associados aos métodos convencionais ¹⁴⁶.

Por outro lado, foram adaptadas fontes de energia alternativas às estratégias preexistentes. A radiação por micro-ondas como fonte alternativa de energia é uma das opções mais exploradas nas últimas décadas ¹⁴⁷, inclusive nalguns métodos clássicos como o de Skraup¹⁴⁸ e de Friedländer¹⁴⁹, permitindo obter tempos de reação substancialmente reduzidos e rendimentos superiores. Adicionalmente, a utilização de micro-ondas constitui uma abordagem mais ecológica, o que também se torna vantajoso tendo em conta a síntese de quinolinas em larga escala a nível mundial ¹⁵⁰.

Arya *et al.* sugeriram um método de síntese de 4-hidroxi-2-oxo-quinolinas (4, Figura III-1.5) partindo de anilina e dietilmalonato, em DMF, utilizando radiação por micro-ondas. O grupo demonstrou a obtenção de rendimentos substanciais, em tempos de reação compreendidos entre 3 e 5 minutos ¹⁵¹. Os compostos **4**, muito interessantes do ponto de vista estrutural devido à possibilidade de tautomeria, são intermediários úteis na síntese de quinolinas funcionalizadas nas posições 2 e 4.

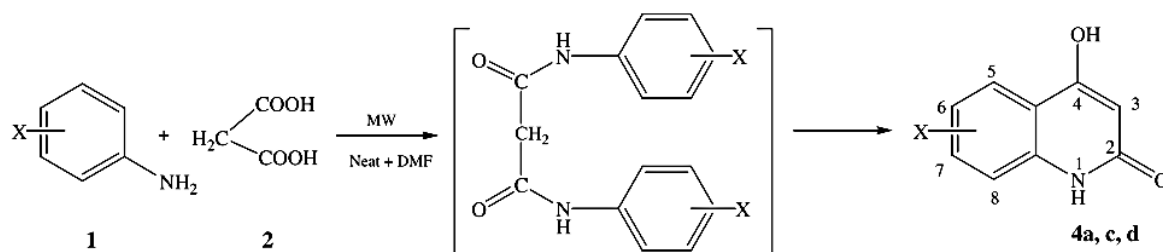


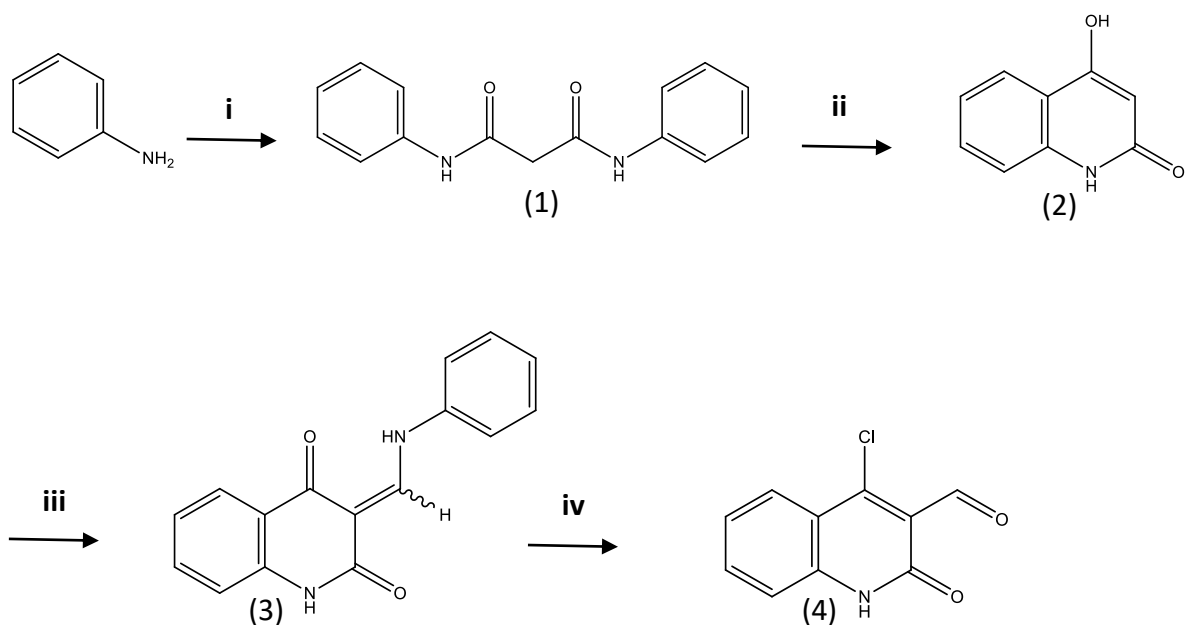
Figura III-16. Representação do esquema geral de síntese de 4-hidroxi-2-oxo-quinolinas segundo o método de Arya *et al.* (Adaptado de¹⁵¹).

Página intencionalmente deixada em branco

IV. SÍNTESE DE DERIVADOS DE QUINOLINA COM ATIVIDADE POTENCIAL AO NÍVEL DO COMPLEXO CDK5-P25

No âmbito da presente monografia foi realizado um trabalho experimental que consistiu na síntese de derivados quinolínicos potencialmente ativos como inibidores do complexo CDK5-p25, responsável pelo processo de hiperfosforilação da proteína tau que, por sua vez, mediante alteração da sua estrutura fisiológica, altera a estrutura e função das células neuronais, conduzindo à sua morte. Esta componente prática foi levada a cabo no Grupo de Reatividade Orgânica e Química Medicinal do Centro de Ciências do Mar, CCMAR, da Universidade do Algarve, liderado pela Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano, e está inserida na área da Química Farmacêutica e Medicinal. Este grupo dedicou-se ao estudo de diversos compostos com estrutura quinolínica com interesse farmacológico no âmbito da malária e da tuberculose. Este trabalho, direcionado para a síntese de derivados de quinolina com interesse farmacológico no contexto da Doença de Alzheimer, constituiu o início de um projeto pioneiro ao qual se pretende dar continuidade futuramente.

Tendo em conta a brevidade do período disponível para a realização do trabalho experimental, assim como a indisponibilidade imediata de alguns reagentes, o objetivo primordial da componente prática consistiu na síntese de um composto quinolínico facilmente modificável ao nível dos seus substituintes, com potencial para funcionar como um bloco de construção que permita, através de introdução de diferentes grupos, construir uma biblioteca de compostos análogos para posterior avaliação da atividade em modelos adequados (**4**, Figura III-16). A abordagem sintética seguida, representada na Figura III-16, incluiu várias etapas, permitindo obter, numa fase inicial, 4-hidroxi-2-oxoquinolinas (**2**), que são posteriormente modificadas por alteração dos substituintes do núcleo quinolínico, obtendo o composto-alvo acima referido. As diferentes moléculas obtidas durante as várias etapas do procedimento experimental foram numeradas de (1) a (4) e designadas por AS1S, AS2S, AS3S e AS4S, respetivamente, sendo (4) o composto-alvo, que assume o papel de composto intermédio a utilizar na fase seguinte deste projeto.



i) Dietilmalonato, DMF, 140°C, 8h, 37%

ii) Ácido polifosfórico, 150°C, 3h, 64%

iii) Anilina, trietilortoformato, etilenoglicol, 140°C, 40min, micro-ondas

iv) POCl₃, DMF, 8h.

Figura IV-1. Representação do esquema de síntese utilizado para preparação do composto-alvo (4).

Para a síntese da 4-hidroxi-2-oxoquinolina (2) utilizou-se um esquema de síntese semelhante ao proposto pelo grupo de Arya¹⁵¹, acima referido, embora com ligeiras modificações. Enquanto este grupo optou por um método de um único passo para obter o núcleo quinolínico, no âmbito deste trabalho optou-se por fazê-lo através de dois passos, segundo a proposta de Chatterjee *et al.*¹⁵² devido ao rendimento mais elevado descrito pelos autores na utilização desta abordagem. Por outro lado, tendo em conta que no início do trabalho experimental o equipamento de micro-ondas estava inacessível, tornou-se necessário encontrar métodos alternativos.

4.1. Síntese do composto (1)

O composto (1), AS1S, foi a primeira molécula da sequência a ser sintetizada e corresponde a uma N¹,N³-difenilmalonamida. Este produto foi obtido por reação da anilina com o dietilmalonato, numa proporção de 2:1, utilizando dimetilformamida como solvente com propriedades catalíticas.

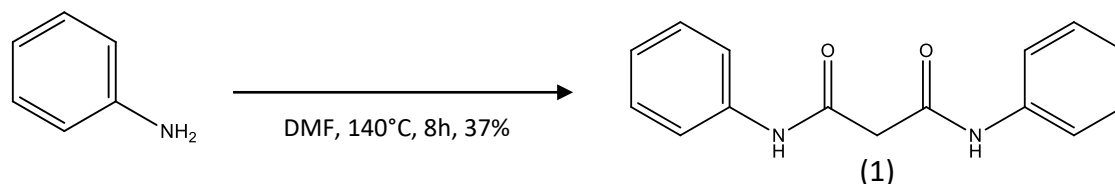


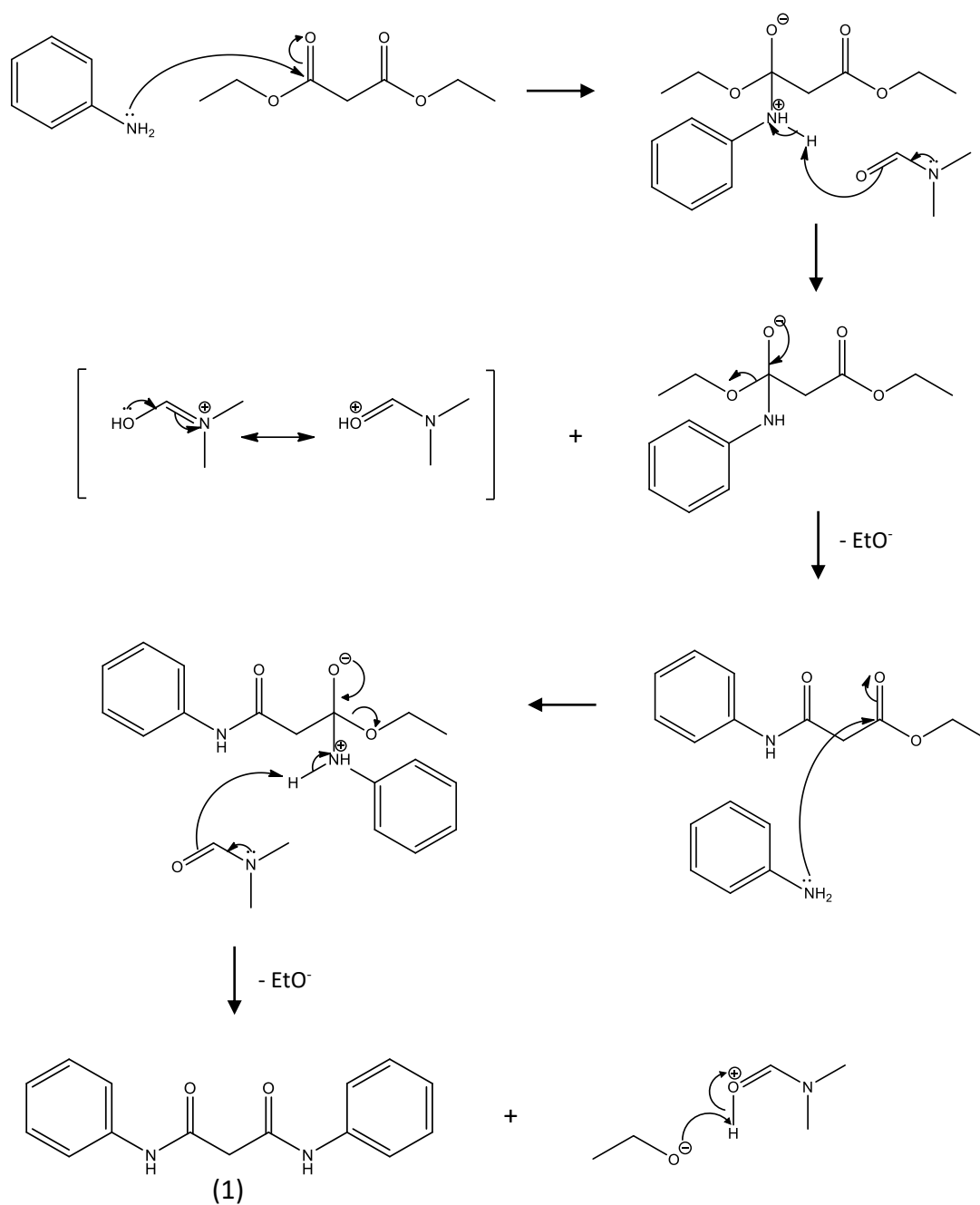
Figura IV-2. Representação do esquema de síntese do composto (1).

De acordo com a literatura¹⁵³, o DMF é um solvente orgânico polar que pode atuar como base de Lewis em presença de ácidos fortes, desprotonando neste caso o aduto resultante do ataque da anilina, agente nucleofílico, ao carbono carbonílico do malonato (eletrófilo) e deslocando assim o equilíbrio no sentido da formação do produto. O ataque nucleofílico da anilina repete-se no outro carbono carbonílico do dietilmalonato, originando o produto de reação AS1S (1), sendo que os grupos etoxi eliminados, pelas suas propriedades de bases fortes, desprotonam o catalisador, permitindo o restabelecimento da sua forma inicial. A proposta mecanística encontra-se representada no Esquema IV-1.

A reação decorreu durante um período de 8 horas a uma temperatura de 140°C, sendo que o rendimento de produto obtido foi de 37%, um valor substancialmente inferior ao descrito na literatura.¹⁵² Partindo de uma solução inicial castanha, resultou o produto AS1S (1), sob a forma de um precipitado branco cristalino.

De seguida apresenta-se uma proposta para o mecanismo de reação envolvido na síntese do composto AS1S.

Esquema IV-1. Proposta mecanística para a reação de síntese do composto (1)



4.2. Síntese do composto (2)

A 4-hidroxi-2-oxo quinolina foi preparada de acordo com a segunda etapa da sequência de síntese. A ciclização do AS1S (1) decorreu através de uma acilação de Friedel-Crafts intramolecular, promovida pelo ácido polifosfórico (PPA), a 150°C ,

durante um período de 3 horas. A reação decorreu com bom rendimento, embora inferior ao referido na literatura ¹⁵².

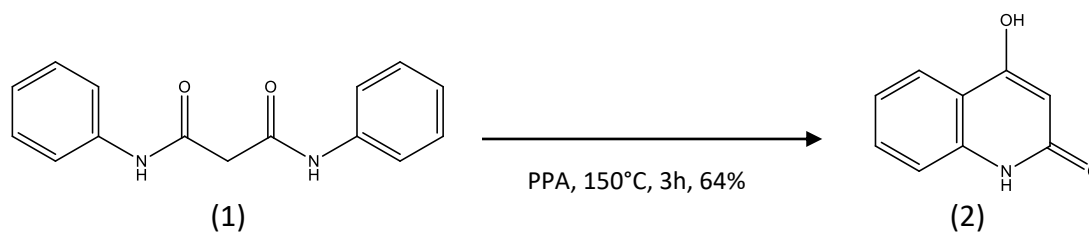


Figura IV-3. Representação do esquema de síntese do composto (2).

O PPA é um ácido de Brønsted-Lowry que, neste contexto, protona o azoto da fenilamida terminal, promovendo a eliminação de anilina previamente à ciclização. Consequentemente, forma-se a sua base conjugada que promove a formação de um anidrido que, por sua vez, favorece o ataque pelo carbono aromático mais nucleofílico, adjacente à amina secundária eletrodadora, ao carbonilo do anidrido mais eletrofílico. Este ataque quebra a aromaticidade do anel temporariamente, ainda que haja estabilização da carga positiva por ressonância, sendo rapidamente restabelecida num passo seguinte pela remoção do protão mais ácido do anel pelo oxigénio carregado negativamente do PPA que foi eliminado na etapa anterior. A proposta mecanística encontra-se representada no Esquema IV-2.

Uma mistura reacional altamente viscosa deu origem a um sólido amarelo pálido após um processo de “*quenching*” resultante da adição de água gelada e um tratamento posterior com ácido, após dissolução do precipitado em NaOH. Estas etapas são essenciais neste passo de síntese, uma vez que o produto desejado corresponde a uma enona conjugada com elevada probabilidade de tautomerização, pelo que se pretende garantir que o produto isolado corresponde ao tautómero 4-hidroxi-2(1H)-quinolona. Embora teoricamente existam cinco possíveis tautómeros para este composto, inclusive o intermediário da reação, 2,4-oxoquinolina, Abdou¹⁵⁴ demonstrou que apenas três tautómeros, ilustrados na Figura IV-3, são identificados na prática.

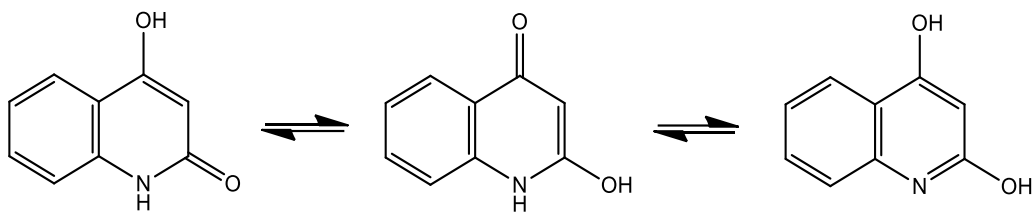
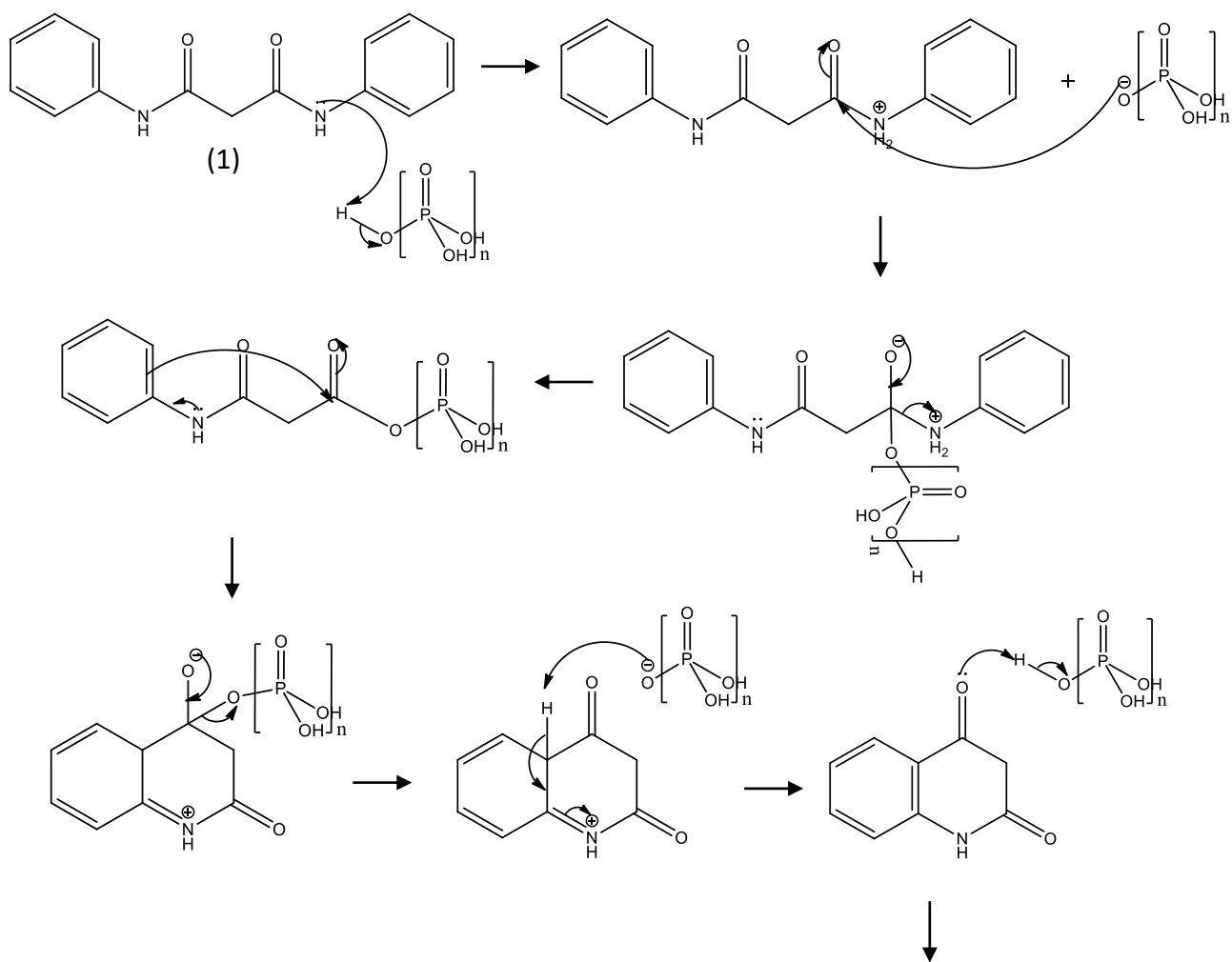
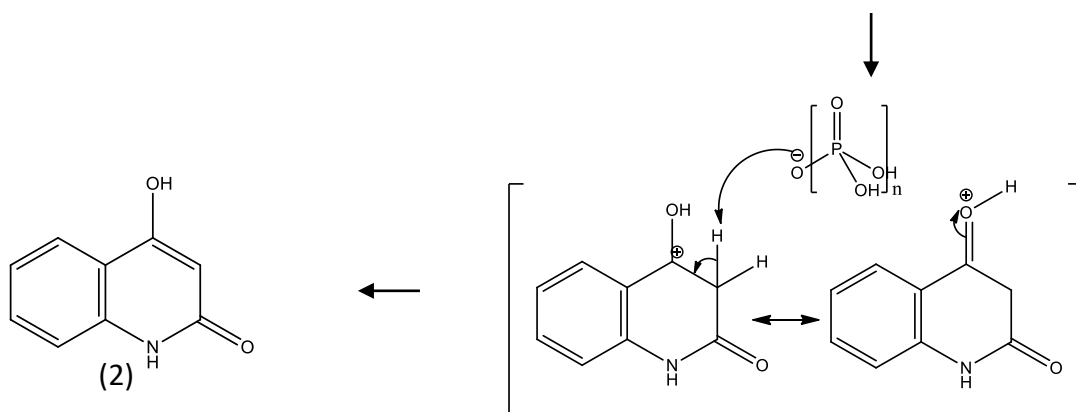


Figura IV-4. Representação das estruturas tautoméricas detetáveis do produto da reação correspondente ao passo ii da sequência de síntese.

Esquema IV-2. Proposta mecanística para a reação de síntese do composto (2), obtido por ciclização de 1.





4.3. Síntese do composto (3)

Os passos **iii** e **iv** da sequência de síntese correspondem a uma modificação da reação de Vilsmeier-Haack, cujo objetivo consiste na formilação do anel aromático em C-3 e cloração em C-4, para permitir fácil inserção de substituintes nessas duas posições na etapa seguinte da sequência reacional. Fiala e Staldbauer¹⁵⁵ demonstraram que a formilação em C-3 e cloração em C-4 não são possíveis em 4-hidroxi-2-oxoquinolinas usando a reação de Vilsmeier-Haack, razão pela qual é necessária a adição de um passo adicional, o passo **iii**, para permitir que seja obtido o produto pretendido na etapa seguinte. Este passo, representado na Figura IV-4, consistiu na transformação da 4-hidroxi-2-oxoquinolina (2) no intermediário fenilaminometileno quinolinodiona (3), para posterior formação do composto-alvo, 4-cloro-3-formil-2-oxoquinolina (4). O procedimento escolhido, contrariamente ao proposto por Fiala¹⁵⁵ que utilizou o método clássico para aquecer a mistura, envolveu a utilização de um equipamento de micro-ondas no qual se fez reagir proporções iguais do composto (2), anilina e trietilortoformato, em etilenoglicol, a 140°C, durante 40 minutos. A literatura descrevia dois procedimentos para esta reação: aquecimento a 145°C e 20 minutos de reação; aquecimento a 140°C e 40 minutos de reação¹⁵². Optou-se por testar os dois procedimentos e tentar ainda um terceiro, que consistiu em aquecimento a 140°C durante 60 minutos, na tentativa de obtenção de maior rendimento. Verificou-se, porém, com base nos espectros de RMN ¹H e ¹³C, que em nenhuma das condições resultou o produto esperado, recuperando-se o composto de partida.

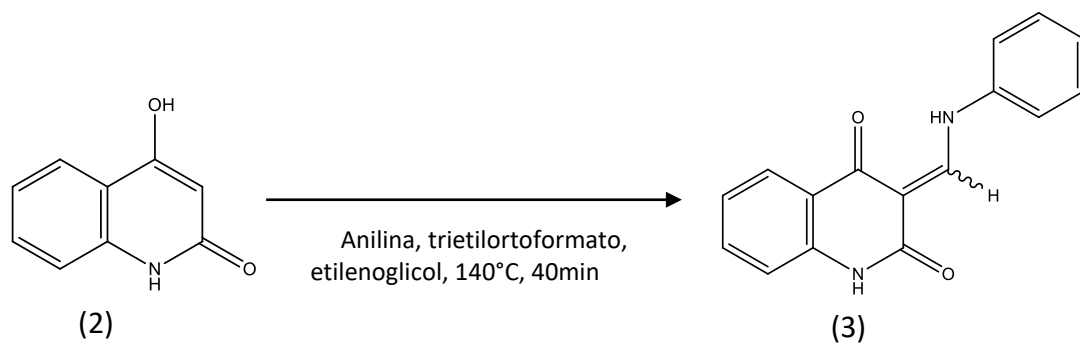
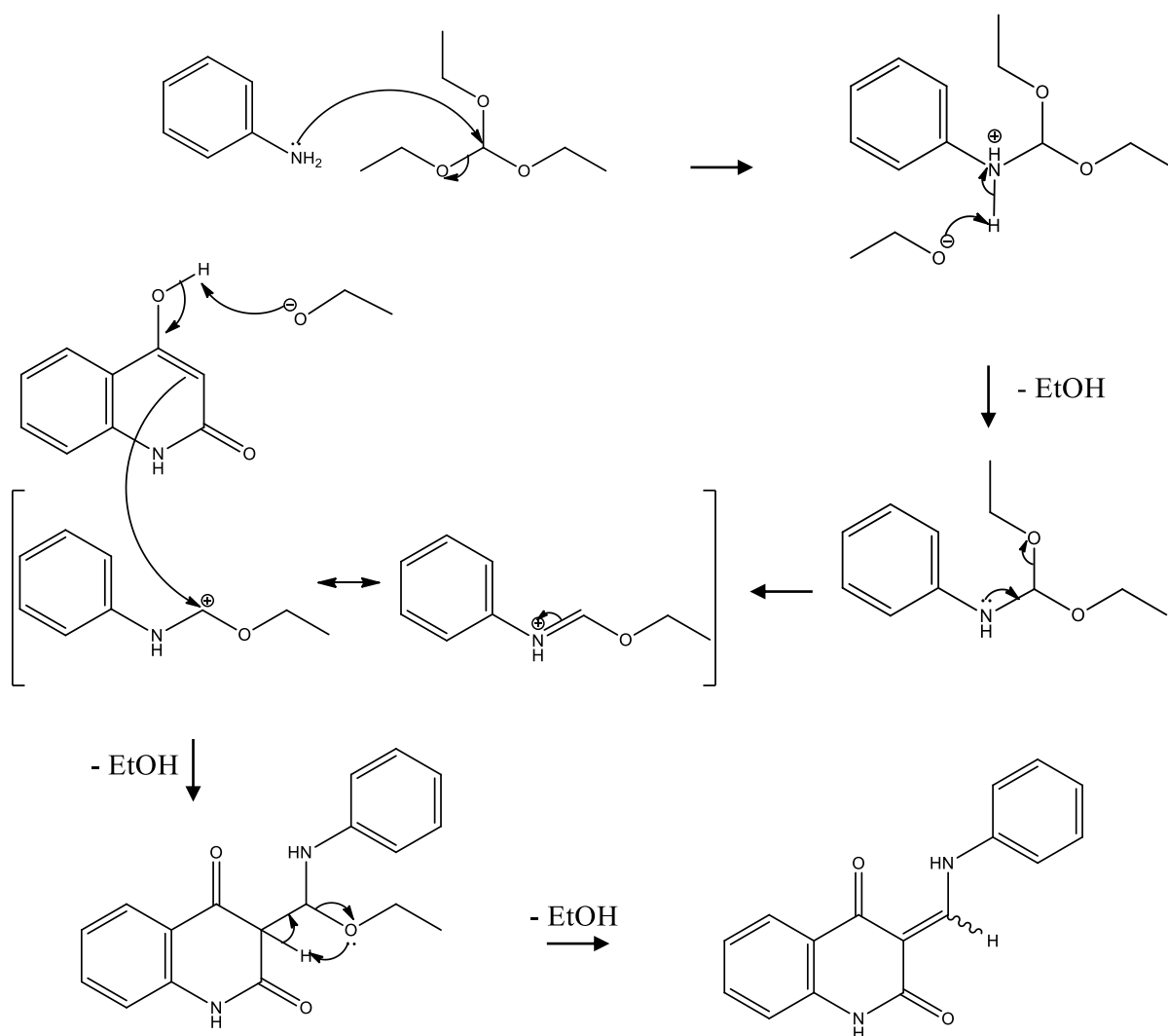


Figura IV-5. Representação do esquema de síntese do composto (3).

A proposta mecanística para a síntese do composto 3 encontra-se representada no Esquema IV-3.

Esquema IV-3. Proposta mecanística para a síntese do composto (3)



4.4. Síntese do composto (4)

Após a obtenção do intermediário (3) torna-se possível sintetizar o composto-alvo (4) utilizando uma metodologia adaptada da reação de Vilsmeier-Haack, tal como representado na Figura IV-5.

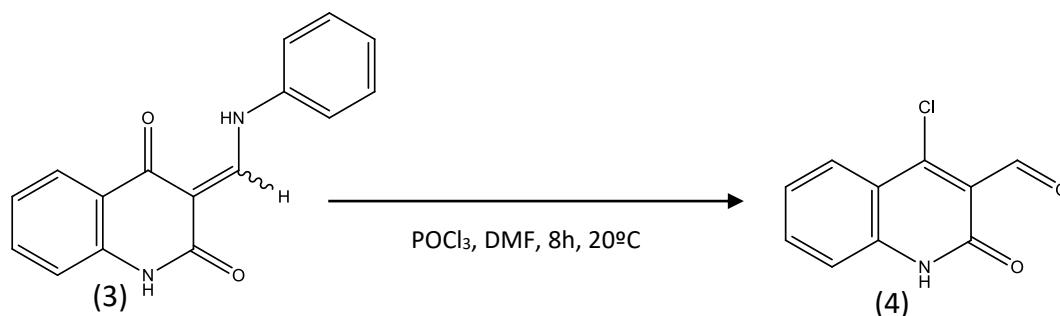
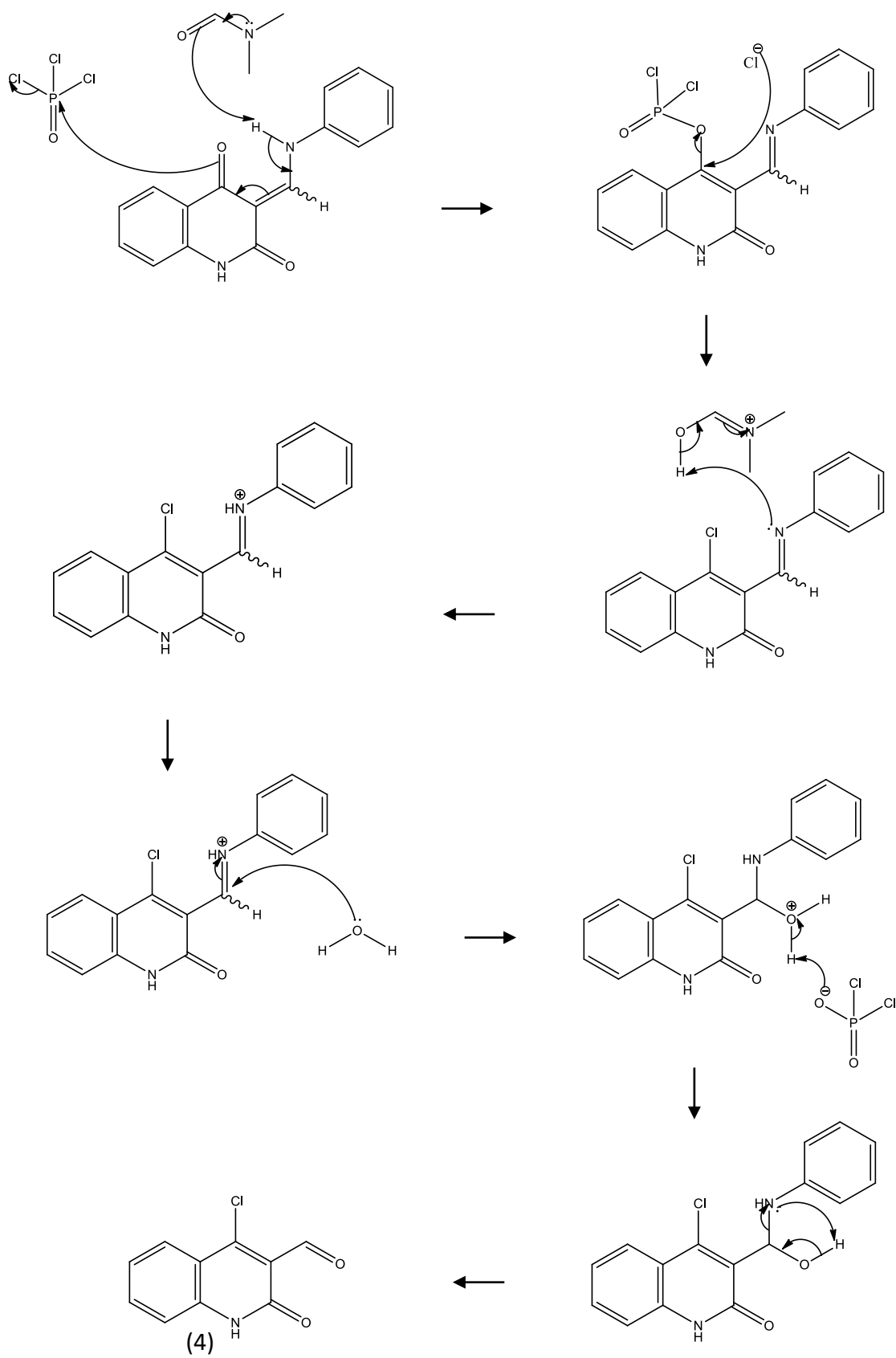


Figura IV-6. Representação do esquema de síntese do composto (4).

Neste caso, contrariamente à reação de Vilsmeier original em que se obtém uma imina, o reagente de Vilsmeier, a partir da reação entre o POCl₃ e o DMF, a imina é gerada diretamente a partir do substituinte fenilaminometileno mediante catálise pelo DMF, após a cloração da quinolina em C-4 mediada pelo POCl₃. Seguidamente, o aldeído obtém-se após um processo de *quenching* com água gelada, que promove a hidratação do carbono da imina, com eliminação de uma molécula de anilina. Esta etapa reacional envolve um período de reação de 8 horas à temperatura ambiente (20°C) e sob agitação constante, ao fim do qual se segue a etapa da adição de água gelada, obtendo-se um sólido amarelo, isolado por filtração. Esta reação não foi realizada no âmbito da presente monografia dado o atraso na obtenção dos resultados de caracterização do produto anterior, pelo que não é indicado um rendimento de produto desta reação obtido pela autora da presente dissertação. A proposta mecanística para a formação do composto 4 nas condições referidas encontra-se representada no Esquema IV-4.

Esquema IV-4. Proposta mecanística para a síntese do composto (4)



A componente de síntese aqui descrita é introdutória, dado o pouco tempo disponível. Todavia, constitui uma base importante para a continuação do projeto de síntese da biblioteca de compostos proposta. Algumas etapas de síntese requerem otimização e outras requerem desenvolvimento. Neste processo será útil estudar em detalhe a estrutura de alguns dos compostos intermédios preparados, pois a informação poderá ditar ajustes nas metodologias de síntese em que participam. Adicionalmente, é muito relevante estudar a estrutura dos compostos-alvo, para melhor prever e interpretar os resultados de atividade biológica e as propriedades farmacológicas.

4.5. Procedimento experimental

Este ponto destina-se à descrição detalhada de todos os procedimentos associados à componente de síntese orgânica, incluindo todas as informações relevantes para a realização da mesma.

4.5.1. Informação gerais sobre materiais e métodos

Todas as etapas da sequência de síntese foram efetuadas com recurso a reagentes e solventes, conforme comercialmente fornecidos por entidades comerciais certificadas (Sigma-Aldrich, a Alfa Aesar, a Merck, a Panreac, a VWR, a Fluka, a LabChem e a Laborspirit).

As reações foram monitorizadas recorrendo à técnica de Cromatografia em Camada Fina, TLC-“*Thin Layer Chromatography*”, utilizando placas de alumínio revestidas por sílica-gel 60 F₂₅₄ e um eluente próprio para cada reação. Para visualização das placas após eluição recorreu-se a uma lâmpada UV a 254 nm e a revelação foi feita em solução de *p*-anisaldeído previamente preparada.

Os compostos obtidos em cada etapa de síntese foram caracterizados com recursos às seguintes técnicas:

1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ¹H e ¹³C, 400 MHz e 101 MHz, respetivamente, utilizando o equipamento Bruker Avance III do

laboratório de RMN do Centro de Química da Universidade de Coimbra. Para esta análise utilizou-se como solvente o dimetilsulfóxido deuterado $(CD_3)_2SO$.

2. Determinação do ponto de fusão, obtido com recurso ao aparelho Melting Point Apparatus SMP3, Bibby Stuart Scientific da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve;

Efetou-se uma requisição dos espetros de massa, embora não se tenha conseguido obter os resultados atempadamente para os apresentar na presente dissertação.

Para esta componente recorreu-se também ao uso de outros equipamentos relevantes no processo de síntese, nomeadamente um aparelho de micro-ondas CEM Discover[®], alimentado por um compressor de ar Condor.

As diferentes estruturas químicas e mecanismos de reação apresentados no presente capítulo foram construídos utilizando o software ChemDraw[®] Ultra 12.0.2.

A previsão, desenho e interpretação dos espetros de RMN foi levada a cabo recorrendo às ferramentas de software ChemDraw[®] Ultra 12.0.2 e MestReNova[®] 6.0.2. Os valores de desvio químico (δ) apresentam-se em partes por milhão (ppm) relativamente ao padrão tetrametilsilano, TMS. A multiplicidade do sinal apresenta-se sob as seguintes formas: s (singuleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto) ou m (multiplete). Os valores de desvio químico correspondentes à quantidade residual de DMSO (δ 1H = 2,54 ppm e δ ^{13}C = 40,45 ppm) e de água (δ 1H = 3,33 ppm), segundo a literatura,¹⁵⁶ no solvente deuterado $(CD_3)_2SO$ foram interpretados como interferentes, pelo que não estão aqui apresentados.

Precede-se em seguida à descrição detalhada dos procedimentos para a preparação dos compostos propostos.

4.5.2. Síntese do composto (1), AS1S

A uma solução contendo 9,8 mL de anilina (10 g, 108 mmol) e 8,25 mL de dietilmalonato (8,7 g, 54 mmol), sob agitação, foi adicionada dimetilformamida (DMF; 5mL), de acordo com o procedimento descrito na literatura¹⁵⁷. A mistura foi aquecida a 140°C durante 8 horas, ao longo das quais foram efetuadas sucessivas análises por TLC,

de forma a observar a evolução da reação, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano, em proporções variáveis. A mistura de 50% acetato de etilo e 50% hexano foi a que permitiu uma observação mais clara da migração de cada composto. Contrariamente ao que se previa na literatura, a análise das TLC's após as 8 horas de reação demonstrou que a reação não tinha sido completa, dado que a anilina não tinha desaparecido completamente da mistura. No final obteve-se um precipitado branco, que foi filtrado e lavado com etanol para obter o produto, incolor e cristalino (5,17 g, 20,33 mmol, 37%). Ponto de fusão 230-231°C; ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 10.17 (s, 2H, NH), 7.62 (d, 4H, Ar-H), 7.32 (t, 4H, Ar-H), 7.07 (t, 2H, Ar-H), 3.49 (s, 2H, CH_2).

A caracterização deste composto através da espectroscopia de RMN do próton ^1H e do ponto de fusão permitiu, por comparação com a literatura¹⁵⁸ e com a previsão fornecida pelo software ChemDraw (Vidé **VIII. Anexos**), identificar o composto obtido como sendo o composto pretendido, a N^1, N^3 -difenilmalonamida.

4.5.3. Síntese do composto (2), AS2S

A uma solução de ácido polifosfórico 84% (22,5 g) a 150°C, sob agitação, adicionou-se, aos poucos, o composto (1) (4,8 g, 18,88 mmol). A reação decorreu durante 3 horas, ao fim das quais se verteu água gelada sobre a mistura para promover a precipitação do produto por um processo de *quenching*. A solução possui uma textura muito viscosa e é necessária bastante água para transformar a textura gomosa num precipitado. Seguidamente, procedeu-se à filtração do precipitado e dissolução do mesmo em 100 mL de NaOH a 1M. O precipitado insolúvel na solução de NaOH foi removido por filtração. O produto (2) foi obtido posteriormente, acidificando a solução anterior com HCl concentrado, adicionando-o lentamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e agitando constantemente até formar o precipitado correspondente ao AS2S. Obtido o precipitado, procedeu-se a uma nova filtração, lavagem do sólido com água destilada e secagem do mesmo sob vácuo, obtendo um produto final sob a forma de sólido amorfo de cor amarelo pálido. (1,94 g, 12,04 mmol, 64%). Ponto de fusão 345-347°C; ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 11.23 (s, 1H, NH), 7.78 (dd, 1H, Ar-H), 7.52 – 7.45

(m, 1H, Ar-H), 7.27 (d, 1H, Ar-H), 7.14 (dd, 1H, Ar-H), 5.76 (s, 1H); ^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 163.55, 162.41, 139.12, 130.81, 122.61, 121.03, 115.02, 98.17.

Este composto, tal como referido no tópico anterior, apresenta um elevado risco de tautomerização e obtenção de isómeros da 4-hidroxi-2(1H)-quinolona. Porém, a interpretação dos resultados obtidos por caracterização e comparação com a literatura e com as previsões fornecidas pelo programa ChemDraw[®] permitem excluir a possibilidade de existência de qualquer outro tautómero no produto da reação.

4.5.4. Síntese do composto (3), AS3S

O composto (2), AS2S, (0,329 g, 2,02 mmol) foi adicionado a um tubo contendo 0,19 mL de anilina (0,19 g, 2,02 mmol) e 0,34 mL de trietilortofornato (0,3 g, 2,02 mmol), em 5 mL de 1,2-etanodiol (etilenoglicol). O tubo foi introduzido num equipamento de micro-ondas e aquecido a 140°C, sob agitação, durante um período de 40 minutos. Desta reação resultou um precipitado amarelo, que foi filtrado e lavado com etanol. Ponto de fusão 348-349°C.

A análise por TLC do sólido resultante indicou presença de impurezas, embora sugerisse a formação de um composto diferente do composto inicial. Por sua vez, a caracterização por espectroscopia de ^{13}C demonstrou que, embora fosse possível detetar alguns picos residuais adicionais no espectro, os picos mais salientes detetáveis demonstraram ser perfeitamente sobreponíveis com os picos do reagente de partida AS2S, à exceção de um pico referente a um desvio químico de 62,76 ppm no espectro, que foi atribuído ao solvente da reação, o etilenoglicol. A mesma sobreposição espectral foi verificada para o espectro de RMN ^1H do composto AS3S, Figura VIII-9 (Anexos). Adicionalmente, o ponto de fusão do sólido resultante foi praticamente idêntico ao composto de partida, pelo que se conclui que o sólido resultante corresponde a uma recuperação do composto de origem, verificando-se vestígios da formação de um composto diferente, que possivelmente diz respeito ao composto (3) que se pretendia sintetizar. O processo de síntese de (3) carece de otimização.

Página intencionalmente deixada em branco

V. ENSAIOS *IN VITRO*

O presente capítulo destina-se à descrição das metodologias, abordagens e fundamento teórico utilizados para realizar um conjunto de ensaios *in vitro* em culturas primárias de neurónios corticais de murganho. Esta componente experimental insere-se na área da Biologia Celular e foi acompanhada e orientada por um grupo de investigação do Centro de Investigação em Biomedicina, CBMR, da Universidade do Algarve, liderado pela Professora Doutora Inês Maria Pombinho de Araújo. Esta componente experimental integrada na presente monografia consistiu, numa fase inicial, no estudo da neurotoxicidade desencadeada por um estímulo externo, neste caso o glutamato, e numa fase posterior, no estudo da neuroprotecção pelos diferentes fármacos quinolínicos propostos para avaliação. O objetivo destes estudos prende-se com a determinação das condições ideais para simular o contexto da doença de Alzheimer, no que toca à sobreatividade da CDK5 e à hiperfosforilação da tau, nomeadamente o período de incubação dos neurónios com glutamato, e seguidamente de verificar qual a concentração máxima de fármaco tolerada pelas células na ausência de um estímulo nocivo, de modo a averiguar, numa fase posterior deste estudo, quais as concentrações ideais de fármaco a utilizar para inibir o complexo CDK5-p25 e impedir a progressão do processo neurotóxico.

5.1. Culturas primárias de neurónios corticais

Para a realização dos estudos biológicos celulares utilizaram-se culturas primárias de neurónios corticais de murganho (*Mus musculus*) da estirpe C57BL6, dado tratar-se de células extraídas diretamente do murganho, permitindo-nos simular de forma mais realista o ambiente *in vivo*. As células foram cultivadas durante o seu período de desenvolvimento embrionário, usando embriões de 14-16 dias, e optou-se por esta abordagem, ao invés da extração no final da gestação, pelas seguintes razões:

- i. os neurónios corticais são gerados entre os dias 11 e 17 do desenvolvimento embrionário;

- ii. os neurónios devem estar preferencialmente indiferenciados para permitir uma melhor dissociação no momento da cultura, uma vez que não existem projeções axónicas e dendríticas salientes que possam ficar danificadas no processo;
- iii. a cultura celular nos dias 14-16 permite obter uma amostra quase totalmente neuronal, tendo em conta que os astrócitos e oligodendrócitos são gerados apenas a partir dos dias 13 e 14 do desenvolvimento embrionário. De notar que, para garantir a ausência de astrócitos e oligodendrócitos na cultura, são também utilizados protocolos e meios de cultura adequados para esse fim;
- iv. as células neuronais indiferenciadas e isentas de terminações nervosas permitem uma remoção mais eficaz das meninges no processo de extração ¹⁵⁹.

Assim, deve garantir-se que os embriões de murganho utilizados para a cultura tenham o número de dias de gestação adequado, caso contrário a cultura poderá ficar enriquecida com contaminantes celulares.

O primeiro passo de todo o processo de cultura corresponde ao acasalamento programado dos murganhos, que é efetuado pelo contacto contínuo durante 48 horas de machos e fêmeas. Seguidamente, no 16º dia após o acasalamento, a fêmea deve ser sacrificada por deslocamento cervical, removendo-se o útero contendo as bolsas embrionárias, das quais os fetos devem ser extraídos cuidadosamente e colocados numa placa de Petri contendo meio salino simples, Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS) e 0,25% de solução de gentamicina 50 mg/mL. Posteriormente, deve proceder-se à decapitação dos fetos e recolha da região pré-frontal do córtex cerebral para uma nova placa de Petri com meio HBSS e gentamicina, idêntico ao anterior. Este procedimento é efetuado com recurso a uma incisão no crânio e remoção das camadas que constituem a pele e o crânio. Obtida a porção cortical dos cérebros de todos os embriões, estes devem ser colocados num tubo de 20 mL contendo uma solução de digestão composta por meio HBSS, 0,125 mg/mL de gentamicina, 0,0025 mg/mL de tripsina e 0,3 µg/mL DNase, que deve ser incubado a 37°C durante 15 minutos para promover a dissociação química do tecido. No final deste período, adiciona-se meio HBSS contendo 10% de soro fetal bovino, FBS, de modo a promover a paragem da reação de digestão, e a mistura resultante é submetida a centrifugação a 105,6g (700 rotações por minuto, rpm), durante 5 minutos. Terminada a digestão química, torna-se necessário completar a

dissociação do tecido mecanicamente. Para tal, aspira-se previamente o sobrenadante e adiciona-se o meio de cultura preparado no laboratório, composto por meio Neurobasal® comercialmente adquirido; um suplemento de aminoácidos rico em glutamina cuja função é melhorar a viabilidade celular e manter as células saudáveis diminuindo a acumulação de amoníaco, GlutaMax®, 2 mM; um antibiótico à base de penicilina e estreptomicina cuja função é inibir a proliferação bacteriana no meio de cultura, PenStrep® (100 unidades/mL de Penicilina e 100 µg/mL Estreptomicina); e um suplemento próprio isento de soro, B27®, 2%, para estimular o crescimento neuronal e simultaneamente impedir o crescimento de outros tipo de células cujo crescimento é estimulado pela presença de soro. Ao sedimento contendo o novo meio de cultura deve então fazer-se a dissociação mecânica com uma pipeta volumétrica de 5 mL numa fase inicial e com uma micropipeta de 1000 µL (P1000), seguidamente, de modo a garantir uma melhor separação das células, sendo a mistura submetida a nova centrifugação, neste caso a 485,1 g (1500 rpm) durante 5 minutos. Tendo o conteúdo celular no sedimento, aspira-se o sobrenadante e ressuspende-se o sedimento em novo meio neurobasal, obtendo-se uma suspensão celular que pode ser cultivada diretamente ou diluída em meio de cultura até se obter a densidade celular pretendida para plaqueamento.

De notar que, antes de se proceder ao plaqueamento, deve fazer-se uma contagem de células para determinar a concentração de células por cada mL de suspensão. Este processo de contagem envolve a diluição de 50 µL de suspensão de células em 100 µL de meio de cultura e 50 µL de solução Trypan blue® e, da suspensão resultante, a pipetagem de 10 µL para uma câmara de Neubauer para se proceder à contagem com o auxílio de um microscópio. A partir do número de células contadas em cada quadrante e do número total de quadrantes da câmara consegue calcular-se o valor estimado de células por mL de suspensão utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ de células por mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10000,$$

em que o fator de diluição é 4, uma vez que a suspensão inicial foi diluída 4 vezes para originar a suspensão utilizada para a contagem.

Findo o processo de determinação da concentração celular, pode proceder-se ao plaqueamento das células em placas de Petri de 12 poços revestidas previamente com poli-L-Lisina 0,1 mg/ml, utilizando uma densidade celular de 1×10^5 células/cm², sendo que cada poço apresenta uma área de 3,6 cm². As células ficam aderidas à superfície das placas contendo a poli-L-lisina. O processo de revestimento das placas não será abordado nesta monografia dado que as placas utilizadas para este trabalho experimental já se encontravam previamente revestidas por outro operador. Consoante o número total de células na suspensão, pipeta-se o volume correspondente às $3,6 \times 10^5$ células, procedendo-se às diluições necessárias da suspensão, caso se aplique. No final, deve obter-se um volume aproximado de 1 mL de células em meio de cultura em cada poço da placa.

Todo o procedimento suprarreferido deve ser levado a cabo numa câmara de fluxo laminar vertical, em ambiente assético, para prevenir a contaminação das células.

No final, as placas de cultura deverão ser mantidas a 37°C, numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% CO₂, durante um período máximo de 19 dias, sendo que neste trabalho experimental optou-se por uma duração de cultura de 11-14 dias, ao fim da qual as células foram submetidas aos vários ensaios propostos. Ao longo deste período as células devem ser vigiadas periodicamente, sendo necessário substituir-se o meio de cultura uma a duas vezes por semana, de modo a fornecer às células os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento à medida que vão sendo consumidos, ou consoante a presença de muitos detritos celulares ou células mortas em suspensão, facto que requer lavagens esporádicas das mesmas. As células neuronais são muito sensíveis a alterações abruptas do meio de cultura, sendo que a substituição do meio não deve ser feita na sua totalidade, de modo impedir variações significativas na osmolaridade e, simultaneamente, reter as substâncias libertadas pelas mesmas, importantes para a sua sobrevivência, cuja eliminação pode resultar em diminuição da viabilidade celular.¹⁶⁰ Como tal, neste processo deve apenas remover-se metade do volume desse meio condicionado pelas células e adicionar a outra metade em meio de cultura fresco e devidamente suplementado. Para garantir que o volume final é de 1 mL, a forma mais correta de fazer a substituição do meio é recolhendo 500 µL do meio condicionado de todos os poços para um tubo de Falcon e aspirar o restante volume.

Seguidamente, adiciona-se 500 µL de meio novo a cada poço e os 500 µL do meio condicionado previamente removido.

Caso existam muitos detritos celulares em suspensão procede-se a uma lavagem das células com tampão fosfato-salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4. O procedimento assemelha-se ao descrito acima, sendo que primeiramente é feita a recolha de 50% do meio de cultura condicionado de todos os poços para um tubo de Falcon, aspirando-se o restante. De seguida, pipeta-se 1 mL de PBS, agita-se ligeiramente para lavar as células aderidas à placa e aspira-se a totalidade do tampão. Por fim, retornam-se os 500 µL do meio condicionado e acrescentam-se os 500 µL do meio novo, levando as placas novamente para a incubadora quando terminado o procedimento.

Nesta componente experimental, todos os reagentes foram utilizados conforme comercialmente fornecidos. O meio de cultura e restantes soluções foram preparados no laboratório, utilizando os reagentes previamente referidos, nas concentrações indicadas.

As medições de absorvância nas diferentes etapas do procedimento foram levadas a cabo com recurso ao equipamento Tecan Infinite® M200. A interpretação dos resultados e construção dos gráficos foi efetuada utilizando o software GraphPad Prism® 7.0.

5.1.1. Ensaio de neurotoxicidade induzida por glutamato

Numa primeira abordagem, o estudo biológico utilizando células neuronais prendeu-se com a estimulação da toxicidade observada na doença de Alzheimer. Para essa estimulação optou-se pela utilização do glutamato, dado o seu elevado nível de segurança, sendo que a outra opção seria a utilização da proteína beta-amiloide, que ficou reservada para estudos futuros. Sabe-se, porém, conforme já referido no capítulo introdutório desta dissertação, que existe uma forte relação entre a excitotoxicidade pelo glutamato e a presença da Aβ, assim como a ativação de proteínas a jusante, nomeadamente a CDK5, mediadoras do processo de toxicidade e morte neuronal. Conforme demonstrado por Harkany *et al.* ¹⁶¹, a beta-amiloide inibe a recaptação do

glutamato, aumentando a sua concentração extracelular e disponibilidade para interagir com os seus recetores, os recetores NMDA, gerando, conseqüentemente, excitotoxicidade por aumento dos níveis de cálcio intracelular. Simultaneamente, demonstrou-se uma íntima associação entre a desregulação da homeostasia do cálcio e a sobreativação da família de proteases designadas de calpaínas, cujo papel fundamental no contexto da DA correlaciona-se com a clivagem do péptido p35 a p25, conduzindo à formação de um complexo proteico CDK5-p25 com funções aberrantes e hiperatividade no que toca à fosforilação dos seus substratos^{37,162}. Como tal, uma estimulação das células neuronais com o neurotransmissor excitatório que participa ativamente na cascata de processos conducentes à neurodegeneração, o glutamato, apresenta fatores que favorecem o desencadear da formação do complexo CDK5-p25, responsável pela hiperfosforilação da proteína tau.

Assim, efetuou-se uma experiência ao longo do tempo para estabelecer o período de recuperação necessário para se observar formação de tau hiperfosforilada, após estimulação com glutamato. A estimulação consiste na introdução de glutamato no meio de cultura durante um período de 15 minutos, após o qual é removido, seguindo-se um período de recuperação de 3 horas, 6 horas e 24 horas, que corresponde ao tempo que as células necessitam, a 37°C, para recuperar do tratamento, até observação do resultado pretendido, a tau hiperfosforilada.

Para concretizar esta experiência, utilizou-se uma concentração de 125 µM de Glu em cada poço submetido a tratamento¹⁶³, sendo que essa concentração foi obtida utilizando 6,25 µL de uma solução *stock* de Glu 20mM para cada 1000 µL de meio de cultura.

Previamente à sua realização, este procedimento deve ser devidamente planificado, de forma a permitir a implementação de condições idênticas em todos os ensaios efetuados. Dado que da cultura celular resultaram 18 poços, cada ensaio foi realizado em triplicado, utilizando 3 poços, cada um com o respetivo controlo, à exceção do tempo de 3h, que apenas se realizou em 2 poços, reservando o 3º poço para um outro ensaio. Este 3º poço corresponde a um ensaio de tratamento contínuo com glutamato durante 24 horas, para possibilitar uma análise comparativa com os restantes ensaios.

Para evitar erros por parte do operador, deve fazer-se uma identificação prévia das placas respeitante aos poços submetidos a ensaio, apresentando-se abaixo o modelo utilizado pela autora da presente dissertação na realização da experiência. A nomenclatura de 24h* e controlo 24h* elegeram-se para designar o ensaio de tratamento contínuo durante 24 horas e o respetivo controlo, de modo a possibilitar a sua distinção dos ensaios de recuperação durante 24 horas.

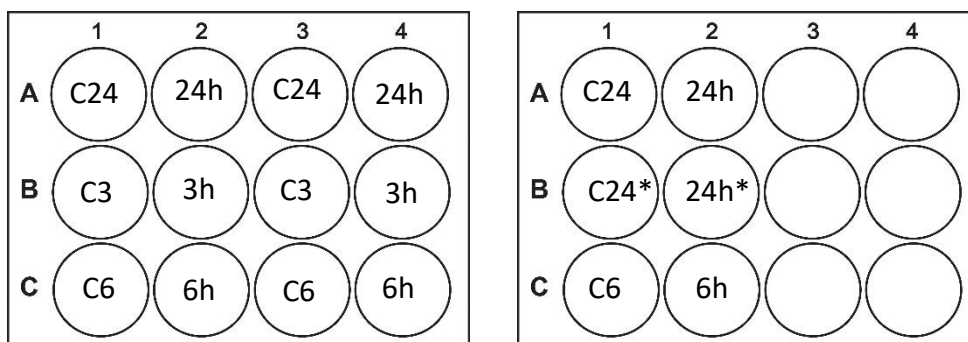


Figura V-1. Representação ilustrativa da metodologia de distribuição e identificação adotada para o ensaio de tratamento das culturas neuronais com glutamato

Seguidamente, procede-se ao primeiro ensaio, que deve ser efetuado 24 horas antes do fim da experiência. O procedimento utilizado para o tempo de 24 horas é repetido posteriormente para os restantes tempos, 6 horas e 3 horas antes do término da experiência. De notar que toda a experiência deve ser levada a cabo em ambiente assético, numa câmara de fluxo laminar vertical. Para além disso, previamente à utilização de qualquer reagente, estes devem ser aquecidos num banho-maria a 37°C. O procedimento seguido para cada ensaio consiste então nos seguintes passos:

- i. Dos poços correspondentes às 24h (tratamentos e controlos) retiram-se 500 µL de meio condicionado e reserva-se num tubo de Falcon;
- ii. A cada poço de tratamento adiciona-se 500 µL de meio de cultura novo contendo 6,25 µL de Glu *stock*. Para facilitar este passo, prepara-se previamente uma solução contendo meio de cultura e Glu correspondente a todos os poços que serão submetidos a tratamento, neste caso para 4 poços (24h e 24h*), e pipeta-se 500 µL dessa solução para todos os poços 24h;
- iii. Aos controlos das 24h adicionam-se apenas 500 µL de meio de cultura fresco;

- iv. Incuba-se a(s) placa(s) a 37°C durante 15 minutos;
- v. Ao fim desse período, aspira-se o conteúdo de todos os poços das 24h e pipeta-se 1 mL de solução Krebs para lavar os poços e eliminar quaisquer vestígios de glutamato, agitando-se ligeiramente a(s) placa(s). Este passo aplica-se também aos controlos;
- vi. Nesta fase tiram-se 500 µL de meio condicionado dos dois poços de tratamento contínuo durante 24h e adicionam-se 500 µL de meio de cultura+Glu ao poço de tratamento e 500 µL de meio de cultura simples ao controlo;
- vii. Aos restantes poços submetidos a tratamento adiciona-se o meio condicionado previamente removido (500 µL) e 500 µL de meio de cultura fresco e incubam-se as placas contendo todos os ensaios a 37°C durante 24h;
- viii. Este procedimento repete-se para os poços das 6 e 3 horas, à exceção da última etapa, sendo que a incubação nestes casos ocorre durante 6 e 3 horas após tratamento, respetivamente;
- ix. Duas horas antes do fim da experiência, coloca-se em todos os poços 100 µL de resazurina 0,1 mg/mL para efetuar o ensaio de viabilidade celular que será abordado detalhadamente mais adiante;
- x. Ao fim das 24 horas de experiência as células devem ser retiradas da incubadora e colocadas sobre gelo de imediato para terminar o ensaio;
- xi. De cada poço devem ser retirados 50 µL de meio, em triplicado, para uma placa de 96 poços para se proceder à leitura da absorvância no ensaio de viabilidade celular;
- xii. O ensaio termina com a preparação de lisados celulares a partir das culturas, e armazenamento das mesmas numa arca congeladora a -80°C para estudos posteriores.

5.1.2. Ensaio de atividade de compostos antimaláricos

No âmbito do presente projeto de investigação propôs-se a avaliação de compostos quinolínicos conhecidos, destinados ao uso noutra patologia humana, cujas estruturas apresentam características promissoras para interagir com o sítio de ligação

do complexo CDK5-p25, estudado neste trabalho. As quinolinas foram a primeira classe de fármacos a ser utilizada no ser humano, no tratamento da malária, conforme previamente descrito no capítulo III. As quinolinas antimaláricas despertaram um elevado interesse para este estudo, uma vez que possuem estruturas cujas características demonstram uma probabilidade significativa de interação com o alvo escolhido no âmbito da presente monografia, representando candidatos excelentes para *drug-repurposing*. Os fármacos eleitos para avaliação neste âmbito foram o quinino, a cloroquina e a amodiaquina.

A planificação do estudo de avaliação dos fármacos antimaláricos no fenómeno de hiperfosforilação da tau envolve a realização de duas componentes: uma primeira etapa, destinada à avaliação da neuroproteção dos fármacos na ausência de qualquer estímulo, de forma a determinar-se a janela terapêutica dos mesmos neste contexto fisiológico (ensaio de neuroproteção); e uma etapa posterior, a realizar futuramente, destinada à avaliação destes compostos em células submetidas a tratamento prévio com glutamato, utilizando diferentes concentrações na gama obtida na etapa anterior, de modo a averiguar-se o efeito dos mesmos ao nível do fenómeno de fosforilação de proteínas tau (ensaio de eficácia terapêutica).

Previamente à realização dos ensaios foi necessário proceder-se à preparação de soluções-*stock* (500 mM) de cada fármaco utilizando os compostos comercialmente fornecidos pela Sigma Aldrich. Utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente na preparação das soluções-*stock*, à exceção da solução de cloroquina, que foi efetuada em água, dada a insolubilidade deste composto em DMSO.

5.1.2.1. Ensaio de neuroproteção

Em estudos biológicos celulares utilizando agentes cuja toxicidade não é conhecida, o primeiro ensaio a realizar deve ser sempre o estudo da toxicidade desse agente no meio em que é introduzido. Este ensaio consiste na determinação da janela terapêutica do agente, que corresponde à gama de concentrações acima da região sub-terapêutica e abaixo da região tóxica, designada, no contexto desta experiência, por região neuroprotetora. Para definir com maior rigor quais as concentrações mais

indicadas a testar na determinação da região neuroprotetora recorreu-se à literatura 164–167.

No âmbito deste projeto, optou-se por testar quatro concentrações de cada fármaco (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M) durante um período de tratamento de 24 horas. Prepararam-se soluções de 0,1 mM, 1mM, 10 mM e 100 mM a partir da solução-*stock* de 500 mM de cada fármaco, com o intuito de se pipetar apenas 1 μ L de cada solução para o respetivo poço para alcançar as concentrações pretendidas. Por outro lado, optou-se por esta abordagem uma vez que se pretendeu obter uma concentração total de DMSO no meio de cultura não superior a 0,1%. Com base no número total de poços disponíveis para a realização da experiência, utilizou-se um mínimo de dois poços de controlo para cada fármaco, aos quais apenas se adicionou 1 μ L de solvente DMSO num volume total de 1 mL. Os controlos respeitantes aos ensaios da cloroquina foram mantidos nas condições de origem, contendo apenas meio de cultura.

Assim, o procedimento utilizado nesta experiência incluiu as seguintes etapas:

- i. Preparação das soluções diluídas de 0,1 mM, 1mM, 10 mM e 100 mM a partir da solução-*stock* de cada fármaco, utilizando um esquema de diluição em série;
- ii. Recolha de 500 μ L de meio condicionado de todos os poços para um tubo de 15 mL;
- iii. Aspiração do restante meio de cada poço;
- iv. Pipetagem de 499 μ L de meio de cultura fresco + 500 μ L de meio condicionado em todos os poços, com exceção dos poços respeitantes aos controlos dos tratamentos com cloroquina, aos quais se adiciona 500 μ L de meio de cultura fresco e 500 μ L de meio condicionado;
- v. Pipetagem de 1 μ L de DMSO em todos os restantes controlos e 1 μ L de cada solução de fármaco;
- vi. Agitação ligeira das placas para promover a mistura de todos os componentes;
- vii. Incubação das placas a 37°C, numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO₂, durante 24 horas;
- viii. Duas horas previamente à conclusão da experiência, introdução de 100 μ L de solução de resazurina 0,1 mg/mL a todos os poços;
- ix. Ao fim das 24 horas, recolha de 50 μ L de meio de cada poço, em triplicado, para uma placa de 96 poços, com o auxílio de uma micropipeta multicanal;

- x. Leitura da absorvância a 570 nm;
- xi. Finalização da experiência, com a preparação de lisados celulares e conservação dos mesmos a numa arca congeladora -80°C.

5.1.3. Ensaio complementares

5.1.3.1. Preparação de lisados celulares

No final de cada ensaio biológico cujo objetivo seja determinar níveis de determinada proteína pode fazer-se a lise das células para permitir a realização de análises subsequentes em proteínas. Este procedimento confere a possibilidade de armazenar os lisados para posterior utilização em diversos ensaios de interesse, nomeadamente a quantificação das proteínas totais, quantificação da tau hiperfosforilada por Western-Blot, entre outros, facto que não seria possível fazer utilizando as células intactas. Por conseguinte, após completados todos os passos enumerados no ponto anterior, é necessário proceder à lise das células, começando-se por aspirar o meio de cultura ou outro meio experimental presente nos poços e procedendo à sua lavagem com PBS, como previamente descrito. Neste ponto, deve então proceder-se à lise propriamente dita pela introdução de uma solução que promove a lise celular e posterior raspagem do conteúdo resultante da superfície revestida das placas. A realização deste passo envolve a utilização de um tampão de lise, seguindo-se abaixo o procedimento adotado.

5.1.3.1.1. Preparação do tampão de lise e lise celular

O primeiro passo da preparação do tampão de lise consiste na preparação de uma solução-*stock* de reagente PIPES a partir de materiais comercialmente adquiridos, nomeadamente 50 mM de ácido 1,4-piperazinedietanesulfónico (PIPES), 50mM de KCl, 10mM de EGTA, 2mM de MgCl e 0,5% de reagente Triton X-100.

O tampão pode ser preparado com antecedência e armazenado a 4°C, tendo apenas de se adicionar os suplementos (inibidores de proteases cOmplete Mini 1x (Roche); inibidores de fosfatases PhosSTOP 1x (Roche); e ditioneitol, DTT, 1 mM) no

momento da realização da experiência. O tampão de lise suplementado deve ser mantido a 4°C até à sua utilização.

No âmbito deste trabalho, no procedimento de lise celular optou-se por utilizar um volume de 30 µL de tampão de lise para cada poço, pelo que, consoante o número de poços, é necessário preparar-se um volume total ligeiramente superior para garantir que existe uma quantidade suficiente para a totalidade dos poços. A quantidade de cada um dos suplementos do tampão de lise a utilizar é determinada nesta etapa com base no volume final de tampão de lise que se decide preparar.

Após a preparação do tampão de lise, pipeta-se 30 µL para cada poço e raspa-se o conteúdo das células da base dos poços com o auxílio de raspadores. Recolhe-se o conteúdo com uma micropipeta e coloca-se em tubos de 1,5 mL devidamente identificados, que são colocados em gelo durante 20 minutos para permitir a atuação do tampão de lise. De seguida ressuspende-se o conteúdo de todos os tubos de 1,5 mL e colocam-se a centrifugar a 15800g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante do processo de centrifugação é recolhido para novos tubos de 1,5 mL devidamente identificados, sendo este o conteúdo proteico final que se conserva a uma temperatura de -80°C para posterior utilização.

5.1.3.2. Ensaio de viabilidade celular

Ao longo de qualquer experiência que envolva tratamento de células com algum agente potencialmente citotóxico devem utilizar-se ensaios de viabilidade celular para determinar se o tratamento em questão teve algum impacto sobre a viabilidade das células expostas. Existe um arsenal de ensaios distintos disponíveis para aplicação em culturas celulares em placas com múltiplos poços, nomeadamente ensaios colorimétricos com reagentes tetrazólicos, ensaios de redução da resazurina, ensaios de fluorescência gerada por proteases, ensaios de ATP luminogénico, entre outros¹⁶⁸. Para este trabalho optou-se por um ensaio de redução da resazurina, que é um reagente redox de cor azul que sofre redução durante o processo de metabolismo celular, originando o produto resorufina que apresenta uma cor rosa, com absorvância a 570 nm e fluorescência na gama 560-590 nm¹⁶⁸.

5.1.3.3. Quantificação de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais é um procedimento integrante de qualquer técnica laboratorial envolvendo extração, purificação ou análise de proteínas¹⁶⁹. Existem diferentes métodos passíveis de serem utilizados para a quantificação das proteínas totais, nomeadamente espectroscopia de absorção UV a 280 nm, método BCA (*Bicinchoninic Acid*), método de Bradford, métodos colorimétricos, entre outros, sendo que a sua escolha deve basear-se nas propriedades e condições das amostras a analisar¹⁷⁰.

Neste trabalho experimental optou-se pelo método BCA para a quantificação das proteínas totais extraídas das culturas de neurónios corticais submetidas a ensaios prévios. O método escolhido baseia-se numa combinação entre a reação de Biureto, que corresponde à redução de Cu^{2+} para Cu^+ pelas proteínas, em ambiente básico, e a deteção colorimétrica do Cu^+ por um reagente cromogénico, o ácido bicinconínico, BCA, que forma um complexo com o ião de cobre reduzido, resultando numa solução com coloração violeta intensa e absorvância a 562 nm¹⁷¹. O reagente BCA é composto por carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico, tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1M.

A conversão dos valores de absorvância em concentração de proteínas é efetuada com recurso a uma reta de calibração, traçada utilizando padrões de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações conhecidas. Estes padrões de BSA, assim como o reagente BCA e a solução de cobre, são comercializados frequentemente em kits próprios, sendo que para este trabalho experimental utilizou-se o Pierce™ BCA Protein Assay Kit da Thermo Scientific, adquirido comercialmente. As componentes deste kit são o reagente BCA ou reagente A, o reagente de sulfato de cobre 4% ou reagente B, e ampolas de solução-*stock* (2 mg/mL) de padrão BSA.

Para além dos componentes referidos, a realização deste ensaio requer a utilização de uma placa de 96 poços e de água purificada. Todas as amostras e padrões devem ser pipetados em triplicado para permitir a obtenção de resultados mais fidedignos. O procedimento geral de quantificação de proteínas segundo o método BCA resume-se aos seguintes passos:

- i. Preparação de uma solução de reagente A e reagente B numa proporção de 50:1 (o volume final desta solução deve ser suficiente para permitir a pipetagem de 200 μ L em cada um dos poços num passo ulterior deste procedimento);
- ii. Pipetagem de 25 μ L de água purificada em cada um dos poços;
- iii. Preparação dos padrões:
 - a. Deve preparar-se sempre um branco contendo apenas 25 μ L de água;
 - b. Deve pipetar-se o volume adequado de padrão BSA (2mg/mL) para obter as concentrações pretendidas de proteína em cada amostra. Neste caso, utilizou-se uma quantidade de proteína BSA de 0,6 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g e 4 μ g para cada solução padrão preparada, respetivamente;
- iv. Pipetagem de 1 μ L de cada amostra nos respetivos poços;
- v. Pipetagem de 200 μ L de solução A+B em todos os poços;
- vi. Incubação da placa a 37°C durante 30 minutos para permitir o prosseguimento da reação;
- vii. Leitura da absorvância a 562 nm.

5.2. Resultados e discussão

5.2.1. Ensaio de toxicidade por glutamato

Conforme referido previamente, o glutamato representa um dos intermediários da cascata de processos patológicos conducentes à hiperfosforilação das proteínas tau. Neste âmbito, para desencadear este processo nas culturas de neurónios corticais de murganho, utilizou-se glutamato 125 μ M, durante 15 minutos, e avaliaram-se vários tempos de recuperação, com o objetivo final de quantificar as proteínas tau hiperfosforiladas em qualquer uma das condições aplicadas. Para uma análise comparativa, realizou-se um ensaio de tratamento contínuo com glutamato 125 μ M, durante 24 horas. Previamente ao passo da quantificação foi necessário realizar um ensaio de viabilidade celular, para averiguar se as condições implementadas no tratamento promoveram citotoxicidade nas células. Os resultados foram obtidos de uma experiência independente, realizada em triplicado, à exceção do ensaio de 3 horas de recuperação e 24 horas de tratamento contínuo, que foram realizados em duplicado

e ensaio único, respetivamente. O efeito do glutamato sobre as células foi analisado mediante uma percentagem da média dos resultados de cada ensaio, comparativamente ao controlo. Os valores obtidos traduzidos graficamente, apresentam-se na figura V-3.

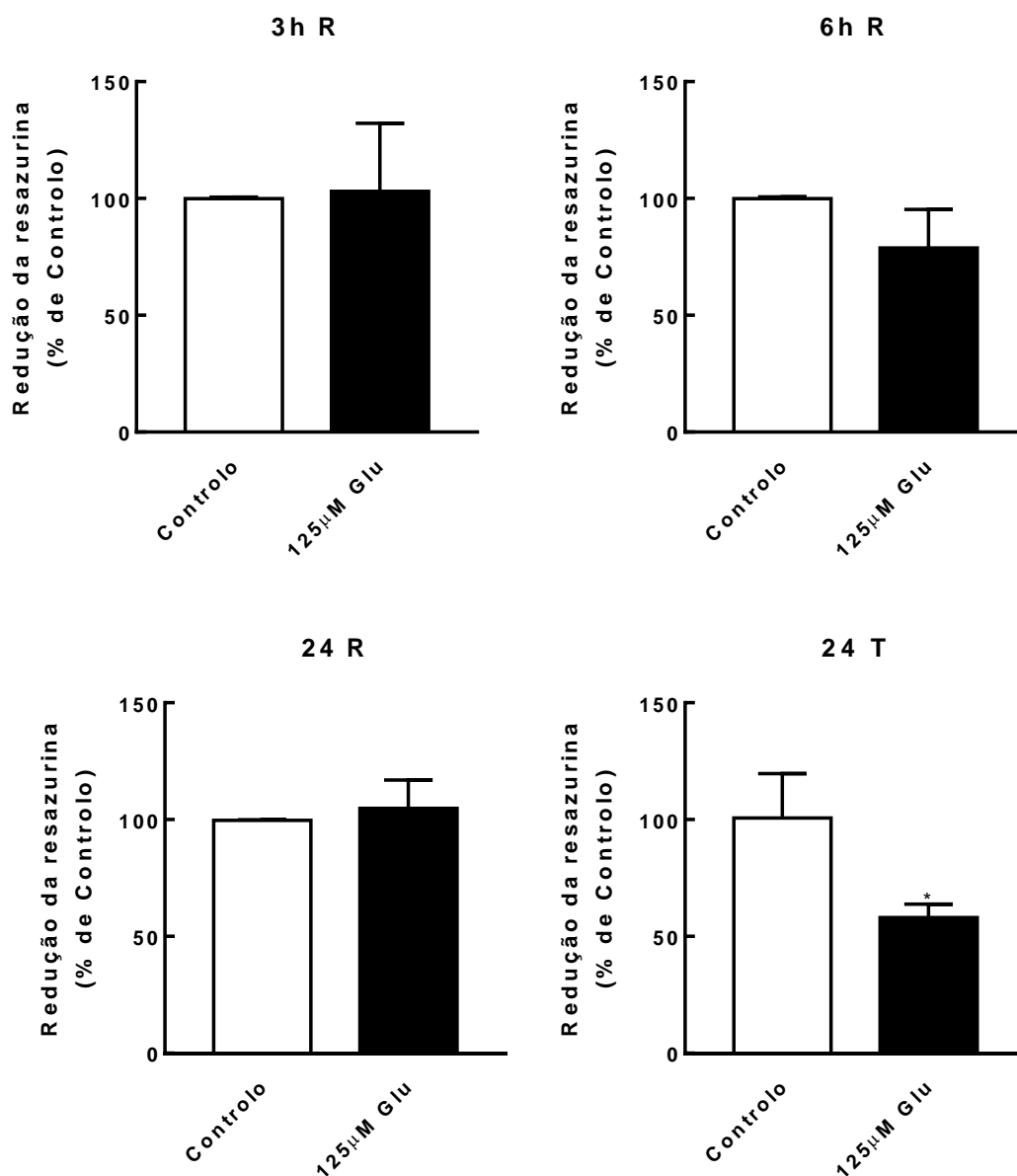


Figura V-3. Representação gráfica do efeito produzido pelo tratamento das culturas de neurónios corticais com glutamato 125 μM, durante 15 minutos, seguido de tempos de recuperação de 3 horas (3h R), 6 horas (6h R) e 24 horas (24h R), e durante 24 horas contínuas (24h T). Os resultados estão apresentados sob a forma de percentagem de controlo (sem tratamento) e estão expressos em média ± erro padrão da média (barras).

* $p < 0,05$, diferença entre médias estatisticamente significativa. Análise através de teste *t-student*.

Com base nas observações, foi possível constatar que, conforme esperado, o tratamento contínuo das células com glutamato durante 24 horas desencadeia morte celular, expressa numa diminuição significativa dos valores de redução da resazurina de $58,05 \pm 3,35\%$ relativamente ao controlo, com $p=0,02$. Relativamente aos ensaios de recuperação após tratamento, verificou-se que a viabilidade das células nos tratamentos é equiparável aos controlos, apresentando percentagens de redução da resazurina relativamente aos controlos de $103,10 \pm 20,62\%$ ($p=0,89$), $78,87 \pm 9,49\%$ ($p=0,09$), e $104,80 \pm 6,89\%$ ($p=0,50$) após 3 horas, 6 horas e 24 horas de recuperação, respetivamente. Estes resultados permitem constatar que, nas condições aplicadas, as células comportam-se de forma semelhante ao descrito na literatura¹⁶³, no que toca à viabilidade após tratamento, não havendo morte celular nestas condições.

No ensaio de tratamento com 6 horas de recuperação detetou-se uma redução não expectável da viabilidade celular comparativamente aos restantes ensaios de recuperação, expressa numa diminuição da redução da resazurina, facto que pode ser devido à distribuição desigual das células pelos diferentes poços ou de uma diminuição temporária da capacidade redutora das células, sendo necessária a realização de mais experiências, ou utilização de outras técnicas para avaliar a viabilidade que não sejam dependentes do número de células.

5.2.2. Ensaio de neuroproteção por fármacos antimaláricos

O ensaio de neuroproteção pelos fármacos antimaláricos baseou-se na incorporação de diferentes concentrações de fármaco nas culturas primárias de neurónios corticais, de modo a identificar a gama de concentrações com efeito neuroprotetor, que possa ser avaliada em testes de atividade nas culturas celulares tratadas com glutamato.

Efetou-se, assim, uma avaliação de cada fármaco antimalárico proposto, nas concentrações de $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$, com exceção da amodiaquina, para a

qual apenas foram testadas as concentrações de 0,1 μM , 1 μM e 10 μM . O efeito de cada concentração de fármaco foi avaliado com recurso ao ensaio de redução da resazurina, em que se analisou a percentagem de redução da resazurina nas amostras comparativamente aos controlos. Os resultados foram obtidos de uma única experiência, e apenas um ensaio para cada concentração. A figura V-4. reúne os dados recolhidos.

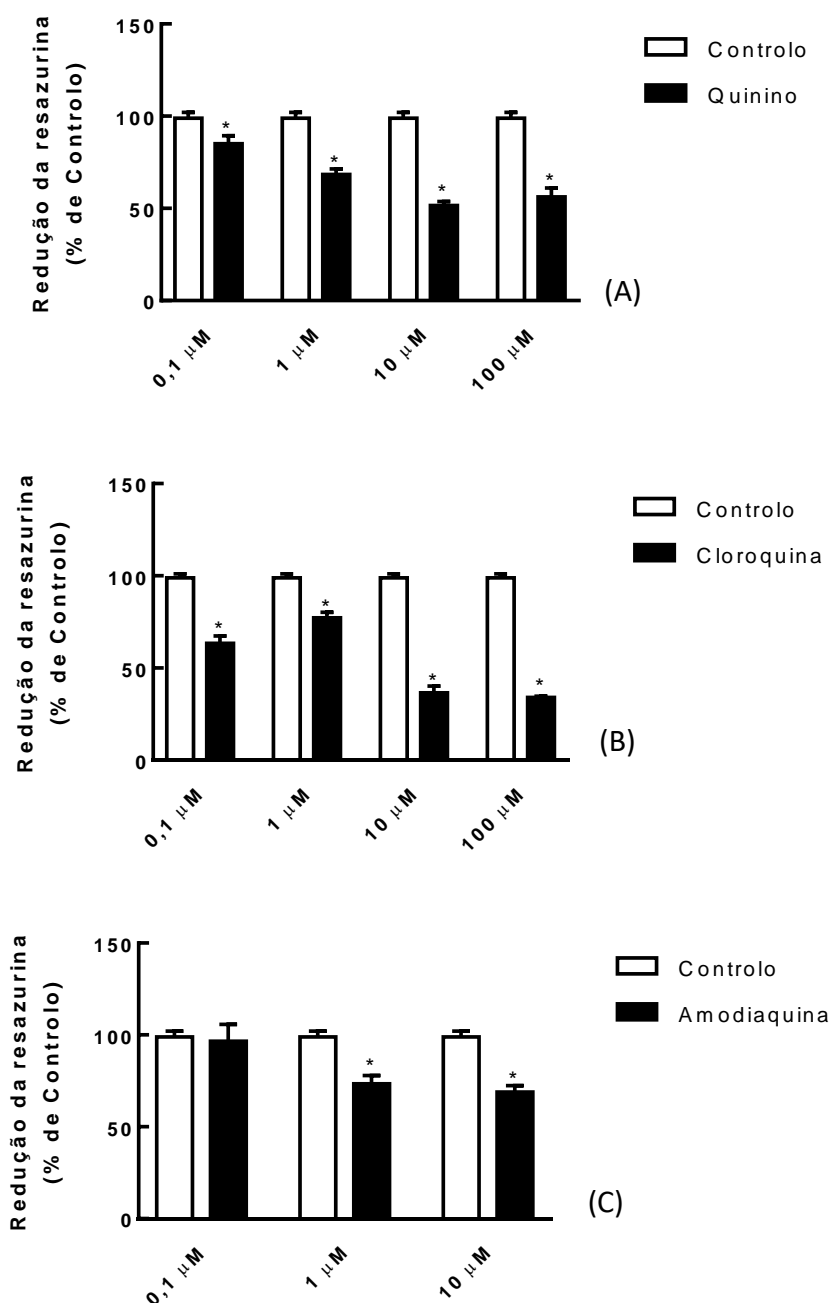


Figura V-4. Representação gráfica do efeito produzido pelo tratamento das culturas de neurónios corticais com quinino (A), cloroquina (B) e amodiaquina (C), a concentrações

de 0,1 μM , 1 μM , 10 μM e 100 μM . Os resultados estão apresentados sob a forma de percentagem de controlo (sem tratamento) e estão expressos em média \pm erro padrão da média (barras). * $p < 0,05$, diferença entre médias estatisticamente significativa. Análise através de teste *t-student* de Holm-Sidak.

Com base nos dados recolhidos, foi possível inferir que, de um modo geral, o aumento da concentração de fármaco resultou num decréscimo na redução da resazurina para todos os casos, salvo algumas exceções. No caso do quinino, verificou-se uma redução da viabilidade celular para todas as concentrações de fármaco avaliadas, tendo-se obtido valores de $85,12 \pm 3,10\%$ ($p=0,01$), $68,33 \pm 2,56\%$ ($p < 0,0003$), $51,67 \pm 2,21\%$ ($p < 0,00003$) e $56,19 \pm 3,35\%$ ($p=0,002$) de redução da resazurina, comparativamente aos controlos, para as concentrações de 0,1 μM , 1 μM , 10 μM e 100 μM , respetivamente. Obtiveram-se resultados semelhantes no caso da cloroquina, nomeadamente percentagens de redução de $63,43 \pm 2,62\%$ ($p < 0,0002$), $77,17 \pm 2,17\%$ ($p < 0,0006$), $36,57 \pm 2,50\%$ ($p < 0,00002$) e $34,04 \pm 1,28\%$ ($p < 0,0000009$), para as concentrações de 0,1 μM , 1 μM , 10 μM e 100 μM , respetivamente. Por sua vez, para a amodiaquina obteve-se $96,55 \pm 5,63\%$ ($p=0,7$), $73,33 \pm 3,26\%$ ($p=0,001$) $68,93 \pm 2,70\%$ ($p < 0,0004$) de redução em relação aos controlos, para as concentrações de 0,1 μM , 1 μM e 10 μM . Conforme referido previamente, à exceção do ensaio com quinino 100 μM e cloroquina 0,1 μM , à medida que se aumentou a concentração de fármaco, a redução da resazurina pelas células foi diminuindo, o que leva a pensar que estes valores possam ter resultado de uma distribuição desigual das células pelos poços, derivada de uma suspensão celular não homogénea. Como tal, é necessário repetir o ensaio nas mesmas condições, de forma a determinar se os resultados obtidos foram derivados das próprias condições do ensaio, ou de algum fator externo ao procedimento.

Por outro lado, com base nos resultados obtidos, verificou-se que, nas condições aplicadas, apenas a amodiaquina 0,1 μM promoveu um efeito neuroprotetor nas células, resultando num valor de $p > 0,05$, devido à diferença estatisticamente não significativa entre a média dos controlos e da amostra.

VI. CONCLUSÃO

A Doença de Alzheimer corresponde a uma das doenças crônicas com maior impacto mundial, a nível económico, social e demográfico. Com os valores de incidência a aumentar de forma substancial, espera-se que num futuro próximo o número de doentes afetados seja próximo de 150 milhões a nível mundial, afetando o bem-estar dos doentes, dos cuidadores e da sociedade envolvente.

Não havendo uma resposta terapêutica suficientemente eficaz para combater a doença ou inibir a sua progressão, torna-se urgente investir em estudos e investigação para possibilitar a oferta de maior qualidade de vida aos portadores desta patologia.

A presente monografia fomentou o início de um projeto de investigação pioneiro cujo objetivo consiste na descoberta de novas opções terapêuticas para os doentes portadores de DA, focando-se num alvo pouco explorado, mas cuja importância foi demonstrada em inúmeras vias patológicas de doenças neurodegenerativas, e numa classe química de excelência em química medicinal, na tentativa de contribuir para o desenvolvimento da ciência no contexto de uma doença tão relevante a nível mundial.

Neste âmbito foram sintetizados três compostos (AS1S, AS2S e AS3S) mediante um esquema de síntese previamente estabelecido, conducente a um composto intermédio a utilizar como bloco de base na construção posterior de uma biblioteca de derivados para avaliação da atividade *in vitro*. O núcleo quinolínicó foi obtido na segunda etapa de síntese (AS2S). A etapa final do esquema de síntese requer otimização, pois da reação obteve-se um sólido composto maioritariamente pelo composto de origem. Ainda que fosse possível observar indícios de formação do novo composto, contrariamente ao que sugere a literatura, a reação não foi completa. O AS3S, embora não tenha sido isolado nas condições referidas, e embora não seja o composto-alvo do presente trabalho, já reúne algumas propriedades estruturais interessantes do ponto de vista farmacológico para interação com o alvo CDK5-p25, pelo que se pretende efetuar, futuramente, testes de atividade deste composto.

Na perspetiva dos ensaios biológicos, foi realizado um ensaio de tratamento de culturas primárias de neurónios corticais de murganho com glutamato, para induzir o processo neurotóxico conducente à hiperfosforilação das proteínas tau pelo complexo CDK5-p25. Da análise efetuada, percebeu-se que o glutamato conduz a um efeito tóxico

nas células, quando tratadas continuamente com este composto, sendo necessário, numa etapa posterior, avançar para uma quantificação da concentração de proteína tau hiperfosforilada após cada tempo de recuperação pós-tratamento com glutamato. Esta análise permitirá definir qual o tempo de recuperação mais adequado para desencadear a hiperfosforilação das proteínas tau, para que se possa avaliar a atividade dos compostos quinolínicos na inibição desse fenómeno.

Ainda neste contexto, realizou-se um ensaio de atividade de alguns compostos antimaláricos (quinino, cloroquina e amodiaquina), cuja estrutura quinolínica e propriedades estruturais demonstram potencial para interação dessas moléculas com o alvo terapêutico. A primeira etapa consistiu numa avaliação da neuroproteção desses fármacos, cujo objetivo consiste na determinação da margem terapêutica destes fármacos no ambiente em que foram inseridos, sendo que os resultados obtidos permitiram verificar que, na gama de concentrações selecionadas, apenas a amodiaquina demonstrou neuroproteção a uma concentração de 0,1 μM . A etapa seguinte deste ensaio consistirá na normalização dos valores obtidos no ensaio anterior e, consoante a janela terapêutica a definir para cada fármaco, progredir para um ensaio de avaliação destas moléculas em células submetidas com glutamato.

Dada a complexidade do projeto de investigação, a curta duração do período disponível para a redação da tese de mestrado e a necessidade de conciliar estas componentes com o estágio curricular, não foi possível concluir o estudo iniciado. Adicionalmente, a duração associada a cada procedimento torna-se um entrave no cumprimento dos objetivos num curto espaço de tempo, citando-se a título de exemplo o procedimento associado à cultura de células, que envolve um período aproximado de um mês para a obtenção de culturas celulares prontas a utilizar nos ensaios propostos.

Porém, embora não se tenha conseguido concluir os estudos, foi possível adquirir e/ou aprofundar um universo de conhecimento científico, não só ao nível da fisiopatologia da doença central do estudo, mas também ao nível da química orgânica e química medicinal, e ainda ao nível de procedimentos e técnicas experimentais, tanto na vertente de síntese orgânica como na de ensaios biológicos, que serão úteis futuramente na continuação dos estudos pendentes propostos para este projeto. Pretende-se, assim, dar continuidade à síntese química e construir uma biblioteca de compostos quinolínicos com potencial atividade no complexo CDK5-p25. Seguidamente

pretende-se avaliar as condições ideais de tratamento com glutamato e repetir o procedimento, nas condições selecionadas, para posterior utilização das moléculas de interesse, incluindo os fármacos antimaláricos, o composto 3 (AS3S), e a biblioteca de derivados sintetizados, nos respetivos ensaios de atividade. O objetivo final deste projeto consiste em encontrar possíveis candidatos a novos fármacos modificadores da doença de Alzheimer e contribuir para proporcionar aos doentes com DA uma qualidade de vida superior, diminuindo o impacto negativo causado por esta patologia.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parks, P. J. in 104 (ReferencePoint Press, 2009). at <<http://www.goodreads.com/book/show/14348153-alzheimer-s-disease>>
2. Alzheimer's Association. Dementia Types | Signs, Symptoms, & Diagnosis. (2017), accessed 20-05-2017, at <<http://www.alz.org/dementia/types-of-dementia.asp>>
3. Lau, L.-F. & Brodney, M. A. in *Current Topics in Medicinal Chemistry - Alzheimer's Disease* (eds. Lau, L.-F. & Brodney, M. A.) 177 (Springer Berlin Heidelberg, 2008). doi:10.1007/978-3-540-74229-6
4. Lukiw, W. J. in *Alzheimer's disease diagnosis and treatments* (ed. Boyd, M. R.) 320 (Nova Science, 2011). at <https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=18492>
5. Hooper, N. M. & Humana Press. *Alzheimer's disease : methods and protocols*. (Humana Press, 2000). at <<https://www.readings.com.au/products/3317399/alzheimers-disease-methods-and-protocols>>
6. Martin Prince, A. *et al.* World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An Analysis of prevalence, Incidence, cost And Trends. (2015). at <<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>>
7. Associação Alzheimer Portugal. Plano Nacional para as Demências em 2014. (2017). at <<http://alzheimerportugal.org/pt/text-0-9-42-280-plano-nacional-para-as-demencias-em-2014>>
8. Alzheimer Portugal. *PLANO NACIONAL DE INTERVENÇÃO ALZHEIMER*. (2009). at <http://alzheimerportugal.org/pt/news_text-77-8-371-mais-um-passo-em-frente-para-o-plano-nacional-para-as-demencias>
9. Hughes, J. C. *Alzheimer's and other dementias*. (Oxford University Press, 2011). at <<https://global.oup.com/academic/product/alzheimers-and-other-dementias-9780199596553?cc=ro&lang=en&>>
10. Wimo, A. & Institutet, K. World Alzheimer Report 2010 Alzheimer's Disease International World Alzheimer Report 2010 The Global Economic Impact of Dementia. at <https://www.alz.org/documents/national/World_Alzheimer_Report_2010.pdf>
11. Prince, M., Comas-Herrera, M. A., Knapp, M., Guerchet, M. & Karagiannidou, M. M. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia coverage, Quality and costs now and In the future. (2016). at <<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf>>
12. Kumar, A., Singh, A. & Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol. Reports* **67**, 195–203 (2015).
13. Magi, S. *et al.* Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease. *Biomed Res. Int.* **2016**, ArXiv ID: 6701324 (2016).
14. Lee, H.-K. *et al.* Three Dimensional Human Neuro-Spheroid Model of Alzheimer's Disease Based on Differentiated Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One* **11(9)**: e0163072. doi:10.1371/journal.pone.0163072, (2016).
15. Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. & Ferreira, A. Tau is

- essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6364–9 (2002).
16. Lei, M. *et al.* Soluble A β oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance. *Neurobiol. Dis.* **85**, 111–21 (2016).
 17. Agis-Torres, A., Sölhuber, M., Fernandez, M. & Sanchez-Montero, J. M. Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **12**, 2–36 (2014).
 18. Puzzo, D., Gulisano, W., Arancio, O. & Palmeri, A. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A β physiology. *Neuroscience* **307**, 26–36 (2015).
 19. Ingelsson, M. *et al.* Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* **62**, 925–31 (2004).
 20. Arbor, S. C., Lafontaine, M. & Cumbay, M. Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J. Biol. Med.* **89**, 5–21 (2016).
 21. Cole, S. L. *et al.* The Alzheimer's disease Beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol. Neurodegener.* **2**, 22 (2007).
 22. Barage, S. H. & Sonawane, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **52**, 1–18 (2015).
 23. Yang, T., Li, S., Xu, H., Walsh, D. M. & Selkoe, D. J. Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. *J. Neurosci.* **37**, 152–163 (2017).
 24. Zhang, Y. *et al.* A lifespan observation of a novel mouse model: in vivo evidence supports a β oligomer hypothesis. *PLoS One* **9**, e85885 (2014).
 25. Liu, S.-L. *et al.* The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **53**, 4328–4342 (2016).
 26. Manassero, G. *et al.* Beta-amyloid 1-42 monomers, but not oligomers, produce PHF-like conformation of Tau protein. *Aging Cell* **15**, 914–923 (2016).
 27. Morris, M., Maeda, S., Vessel, K. & Mucke, L. The many faces of tau. *Neuron* **70**, 410–26 (2011).
 28. Takahashi, R. H., Nagao, T. & Gouras, G. K. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol. Int.* **67**, 185–193 (2017).
 29. Leroy, K. *et al.* Lack of Tau Proteins Rescues Neuronal Cell Death and Decreases Amyloidogenic Processing of APP in APP/PS1 Mice. *AJPA* **181**, 1928–1940 (2012).
 30. Collier, T. J., Götz, J., Bloom, G. S. & Khan, S. S. Tau: The Center of a Signaling Nexus in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* **10**, (2016).
 31. Oddo, S. *et al.* Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J. Biol. Chem.* **281**, 39413–23 (2006).
 32. Kimura, T., Ishiguro, K. & Hisanaga, S.-I. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 65 (2014).
 33. Alzforum. ALZFORUM, Networking for a Cure. *Treating Tau: Finally, Clinical Candidates Are Stepping into the Ring* (2017). Accessed 02-05-2017, at <<http://www.alzforum.org/news/conference-coverage/treating-tau-finally-clinical-candidates-are-stepping-ring>>
 34. Kocahan, S. & Doğan, Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau

- Protein and Other Risk Factors. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **15**, 1–8 (2017).
35. Vincent Chen, H.-S. *et al.* Open-Channel Block of V-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Responses by Memantine: Therapeutic Advantage against NMDA Receptor-mediated Neurotoxicity. *J. Neurosci.* **72**, 4427–4436 (1992).
 36. ClineP, H. T. & Tsien, R. W. Glutamate-induced increases in intracellular Ca²⁺ in cultured frog tectal cells mediated by direct activation of NMDA receptor channels. *Neuron* **6**, 259–267 (1991).
 37. Araújo, I. M., Carreira, B. P., Carvalho, C. M. & Carvalho, A. P. Calpains and Delayed Calcium Deregulation in Excitotoxicity. *Neurochem. Res.* **35**, 1966–1969 (2010).
 38. Tadic, V., Prell, T., Lautenschlaeger, J. & Grosskreutz, J. The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, (2014).
 39. Huang, Y. *et al.* Modulating the Balance of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Shows Positive Effects against Amyloid- β -Induced Neurotoxicity. *J. Alzheimer's Dis.* **57**, 885–897 (2017).
 40. Sinnen, B. L., Bowen, A. B., Gibson, E. S. & Kennedy, M. J. Local and Use-Dependent Effects of β -Amyloid Oligomers on NMDA Receptor Function Revealed by Optical Quantal Analysis. *J. Neurosci.* **36**, 11532–11543 (2016).
 41. Arbel-Ornath, M. *et al.* Soluble oligomeric amyloid- β induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain. *Mol. Neurodegener.* **12**, 27 (2017).
 42. Kuchibhotla, K. V *et al.* Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* **59**, 214–25 (2008).
 43. Dhavan, R. & Tsai, L.-H. A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 749–759 (2001).
 44. Bertram, L. & Tanzi, R. E. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1449–57 (2005).
 45. Chartier-Harlin, M.-C. *et al.* Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature* **353**, 844–846 (1991).
 46. Risch, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* **405**, 847–856 (2000).
 47. Levy-Lahad, E. *et al.* Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (80-.)*. **269**, (1995).
 48. Rosenberg, R. N. Molecular Neurogenetics. *JAMA* **278**, 1282 (1997).
 49. Finch, C. E. & Tanzi, R. E. Genetics of Aging. *Science (80-.)*. **278**, (1997).
 50. Mancuso, M., Carlesi, C., Piazza, S. & Gabriele Siciliano. in *Alzheimer's disease diagnosis and treatments* (ed. Boyd, M. R.) 320 (Nova Science, 2011). at <https://books.google.pt/books/about/Alzheimer_s_Disease_Diagnosis_and_Treatment.html?id=pKK3cQAACAAJ&redir_esc=y>
 51. Farlow, M. R., Miller, M. L. & Pejovic, V. Treatment options in Alzheimer's disease: maximizing benefit, managing expectations. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **25**, 408–22 (2008).
 52. Nadri, H. *et al.* 5,6-Dimethoxybenzofuran-3-one derivatives: a novel series of dual Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase inhibitors bearing benzyl pyridinium moiety. *DARU J. Pharm. Sci.* **21**, 15 (2013).

53. Shigeta, M. & Homma, A. Donepezil for Alzheimer's Disease: Pharmacodynamic, Pharmacokinetic, and Clinical Profiles. *CNS Drug Rev.* **7**, 353–368 (2006).
54. Ehret, M. J. & Chamberlin, K. W. Current Practices in the Treatment of Alzheimer Disease: Where is the Evidence after the Phase III Trials? *Clin. Ther.* **37**, 1604–1616 (2015).
55. 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.* **8**, 159–176 (2006).
56. Onor, M. L., Trevisiol, M. & Aguglia, E. Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clin. Interv. Aging* **2**, 17–32 (2007).
57. Seltzer, B. Donepezil: an update. *Expert Opin. Pharmacother.* **8**, 1011–1023 (2007).
58. Mishra, C. B., Manral, A., Kumari, S., Saini, V. & Tiwari, M. Design, synthesis and evaluation of novel indandione derivatives as multifunctional agents with cholinesterase inhibition, anti- β -amyloid aggregation, antioxidant and neuroprotection properties against Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 3829–3841 (2016).
59. Rogawski, M. A. & Wenk, G. L. The Neuropharmacological Basis for the Use of Memantine in the Treatment of Alzheimer's Disease. *CNS Drug Rev.* **9**, 275–308 (2006).
60. Prvulovic, D. *et al.* The future of Alzheimer's disease: The next 10 years. *Prog. Neurobiol.* **95**, 718–728 (2011).
61. Chen, H. *et al.* Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Neurosci.* **12**, (1992).
62. Tyler, M. W., Yourish, H. B., Ionescu, D. F. & Haggarty, S. J. Classics in Chemical Neuroscience: Ketamine. *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 1122–1134 (2017).
63. Rammes, G., Danysz, W. & Parsons, C. G. Pharmacodynamics of memantine: an update. *Curr. Neuropharmacol.* **6**, 55–78 (2008).
64. Santos, C. Y. *et al.* Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimer's Dement. (Amsterdam, Netherlands)* **7**, 69–87 (2017).
65. Mistridis, P. *et al.* Use it or lose it! Cognitive activity as a protective factor for cognitive decline associated with Alzheimer's disease. *Swiss Med. Wkly.* **147**, w14407 (2017).
66. Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S.-Y. & Kirschner, M. W. A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly (tau factor/tubulin/electron microscopy/phosphocellulose). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 1858–1862 (1975).
67. Schmitt, F. O. Fibrous Proteins-Neuronal Organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **60**, 1092–1101 (1968).
68. Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006247 (2012).
69. Guo, T., Noble, W. & Hanger, D. P. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* **133**, 665–704 (2017).
70. Huang, Y., Wu, Z. & Zhou, B. Behind the curtain of tauopathy: a show of multiple players orchestrating tau toxicity. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 1–21 (2016).

71. Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X. & Grundke-Iqbal, I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* **7**, 656–64 (2010).
72. Hanger, D. P. *et al.* Intracellular and Extracellular Roles for Tau in Neurodegenerative Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **40**, S37–S45 (2014).
73. Plattner, F., Angelo, M. & Giese, K. P. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 25457–25465 (2006).
74. Ittner, L. M. & Götz, J. Amyloid- β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 67–72 (2011).
75. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **15**, 122 (2014).
76. Lopes, J. P. & Agostinho, P. Cdk5: Multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog. Neurobiol.* **94**, 49–63 (2011).
77. Doonan, J. H. & Kitsios, G. Functional Evolution of Cyclin-Dependent Kinases. *Mol. Biotechnol.* **42**, 14–29 (2009).
78. Monaco, E. A. I. I. Recent Evidence Regarding a Role for Cdk5 Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **1**, 33–38 (2004).
79. Su, S. C. & Tsai, L. H. Cyclin-dependent kinases in brain development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 465–491 (2011).
80. Gentry N. Patrick, Lawrence Zukerberg, Margareta Nikolic, Suzanne de la Monte, P. D. & L.-H. T. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615–622 (1999).
81. Hisanaga, S. & Endo, R. Regulation and role of cyclin-dependent kinase activity in neuronal survival and death. *J. Neurochem.* **115**, 1309–1321 (2010).
82. Asada, A. *et al.* Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cyclin-dependent kinase 5 complexes. *J. Neurochem.* **106**, 1325–1336 (2008).
83. Amin, N. D., Albers, W. & Pant, H. C. Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activation requires interaction with three domains of p35. *J. Neurosci. Res.* **67**, 354–362 (2002).
84. Tarricone, C. *et al.* Structure and regulation of the CDK5-p25nck5a complex. *Mol. Cell* **8**, 657–669 (2001).
85. Liu, F. *et al.* Regulation of amyloid precursor protein (APP) phosphorylation and processing by p35/Cdk5 and p25/Cdk5. *FEBS Lett.* **547**, 193–196 (2003).
86. Giese, K. P. Generation of the Cdk5 activator p25 is a memory mechanism that is affected in early Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 36 (2014).
87. Seo, J. *et al.* Activity-dependent p25 generation regulates synaptic plasticity and A β -induced cognitive impairment. *Cell* **157**, 486–498 (2014).
88. Kahnberg, P. *et al.* The use of a pharmacophore model for identification of novel ligands for the benzodiazepine binding site of the GABAA receptor. *J. Mol. Graph. Model.* **23**, 253–261 (2004).
89. Zhang, X. *et al.* Diaminotriazoles modify Tau phosphorylation and improve the tauopathy in mouse models. *J. Biol. Chem.* **288**, 22042–56 (2013).
90. Chatterjee, A., Cutler, S. J., Doerksen, R. J., Khan, I. A. & Williamson, J. S. Discovery of thienoquinolone derivatives as selective and ATP non-competitive CDK5/p25 inhibitors by structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 6409–6421 (2014).
91. Zhong, W. *et al.* Design and synthesis of quinolin-2(1H)-one derivatives as potent

- CDK5 inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17**, 5384-5389 (2007).
92. Kumar, D. V. *et al.* Quinolones as HCV NS5B polymerase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 82-87 (2011).
 93. Serrao, E. *et al.* Fragment-Based Discovery of 8-Hydroxyquinoline Inhibitors of the HIV-1 Integrase–Lens Epithelium-Derived Growth Factor/p75 (IN–LEDGF/p75) Interaction. *J. Med. Chem.* **56**, 2311–2322 (2013).
 94. Li, K. *et al.* Synthesis and biological evaluation of quinoline derivatives as potential anti-prostate cancer agents and Pim-1 kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 1889–1897 (2016).
 95. Naeem, A., Badshah, S., Muska, M., Ahmad, N. & Khan, K. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules* **21**, 268 (2016).
 96. de Souza, M. V. N. *et al.* Synthesis and in vitro antitubercular activity of a series of quinoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 1474–1480 (2009).
 97. AlMatar, M., AlMandea, H., Var, I., Kayar, B. & Köksal, F. New drugs for the treatment of Mycobacterium tuberculosis infection. *Biomed. Pharmacother.* **91**, 546–558 (2017).
 98. Murray, M. C. & Perkins, M. E. in *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 141–150 (1996). doi:10.1016/S0065-7743(08)60454-6
 99. Foley, M. Quinoline Antimalarials Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. *Pharmacol. Ther.* **79**, 55–87 (1998).
 100. Kumar, A. *et al.* A comprehensive review on synthetic approach for antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **85**, 147–178 (2014).
 101. Saraiva, M. T. *et al.* 7-Chloroquinoline-1,2,3-triazoyl Carboxylates: Organocatalytic Synthesis and Antioxidant Properties. *J. Braz. Chem. Soc.* **27**, 41–53 (2015).
 102. Musiol, R. *et al.* Antifungal properties of new series of quinoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 3592–3598 (2006).
 103. Zajdel, P. *et al.* Quinoline- and isoquinoline-sulfonamide analogs of aripiprazole: novel antipsychotic agents? *Future Med. Chem.* **6**, 57–75 (2014).
 104. Nagashima, T. *et al.* Discovery of Novel Forkhead Box O1 Inhibitors for Treating Type 2 Diabetes: Improvement of Fasting Glycemia in Diabetic db/db Mice. *Mol. Pharmacol.* **78**, (2010).
 105. Zou, P. *et al.* Targeting FoxO1 with AS1842856 suppresses adipogenesis. *Cell Cycle* **13**, 3759–67 (2014).
 106. Zhi, Y. *et al.* 4-Quinolone-3-carboxylic acids as cell-permeable inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 3670–3683 (2014).
 107. Whiteside, G., Lee, G. & Valenzano, K. The Role of the Cannabinoid CB2 Receptor in Pain Transmission and Therapeutic Potential of Small Molecule CB2 Receptor Agonists. *Curr. Med. Chem.* **14**, 917–936 (2007).
 108. Mugnaini, C. *et al.* Investigations on the 4-Quinolone-3-carboxylic Acid Motif. 7. Synthesis and Pharmacological Evaluation of 4-Quinolone-3-carboxamides and 4-Hydroxy-2-quinolone-3-carboxamides as High Affinity Cannabinoid Receptor 2 (CB2R) Ligands with Improved Aqueous Solu. *J. Med. Chem.* **59**, 1052–1067 (2016).
 109. Murikinati, S. *et al.* Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment. *FASEB J.* **24**, 788–98

- (2010).
110. Reis, A. S. *et al.* 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: Contribution of the glutamatergic system. *J. Psychiatr. Res.* **84**, 191–199 (2017).
 111. O'Donnell, J. A. & Gelone, S. P. Fluoroquinolones. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **14**, 489–513 (2000).
 112. Meshnick, S. R. & Dobson, M. J. in *Antimalarial Chemotherapy* (ed. Philip J. Rosenthal MD) 15–25 (Humana Press, 2001). doi:10.1007/978-1-59259-111-4_2
 113. SMITH, D. C. Quinine and Fever: The Development of the Effective Dosage. *J. Hist. Med. Allied Sci.* **XXXI**, 343–367 (1976).
 114. Hofheinz, W. and Merkli, B. in *Antimalarial Drugs II: Current Antimalarials and New Drug Developments* (eds. Peters, W. & Rogers, W. H. G.) 61–81 (Springer Berlin Heidelberg, 1984). doi:10.1007/978-3-642-69254-3
 115. Schirmer, R. H. *et al.* Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Rep.* **8**, 272–275 (2003).
 116. Solomon, V. R. & Lee, H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.* **625**, 220–233 (2009).
 117. O'Neill, P. M., Bray, P. G., Hawley, S. R., Ward, S. A. & Park, B. K. 4-Aminoquinolines-Past, Present, and Future: A Chemical Perspective. *Pharmacol. Ther.* **77**, 29–58 (1998).
 118. Njaria, P. M., Okombo, J., Njuguna, N. M. & Chibale, K. Chloroquine-containing compounds: a patent review (2010–2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* **25**, 1003–1024 (2015).
 119. Parhizgar, A. R. & Tahghighi, A. Introducing New Antimalarial Analogues of Chloroquine and Amodiaquine: A Narrative Review. *Iran. J. Med. Sci.* **42**, 115–128 (2017).
 120. Fu, C.-L., Hsu, L.-S., Liao, Y.-F. & Hu, M.-K. New Hydroxyquinoline-Based Derivatives as Potent Modulators of Amyloid- β Aggregations. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **349**, 327–341 (2016).
 121. Zhang, F.-F. & Li, J. Inhibitory effect of chloroquine derivatives on presenilin 1 and ubiquilin 1 expression in Alzheimer's disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 7640–3 (2015).
 122. Liu, P. *et al.* 4-Oxo-1,4-dihydro-quinoline-3-carboxamides as BACE-1 inhibitors: Synthesis, biological evaluation and docking studies. *Eur. J. Med. Chem.* **79**, 413–421 (2014).
 123. Marella, A. *et al.* Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharm. J.* **21**, 1–12 (2013).
 124. Calhoun, A., Ko, J. & Grossberg, G. T. Emerging chemical therapies targeting 5-hydroxytryptamine in the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **22**, 101–105 (2017).
 125. Ryan, T. M. *et al.* Stabilization of Nontoxic A β -Oligomers: Insights into the Mechanism of Action of Hydroxyquinolines in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **35**, (2015).
 126. Lu, J. *et al.* Syntheses, neural protective activities, and inhibition of glycogen synthase kinase-3 β of substituted quinolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 3392–7 (2014).

127. Prati, F. *et al.* Novel 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Multitarget Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *ChemMedChem* **11**, 1284–1295 (2016).
128. Xia, C.-L. *et al.* Design, synthesis and evaluation of 2-arylethenyl- N -methylquinolinium derivatives as effective multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **130**, 139–153 (2017).
129. Wu, Q., Kang, H., Tian, C., Huang, Q. & Zhu, R. Binding Mechanism of Inhibitors to CDK5/p25 Complex: Free Energy Calculation and Ranking Aggregation Analysis. *Mol. Inform.* **32**, 251–260 (2013).
130. Zhang, X. *et al.* Diaminothiazoles modify tau phosphorylation and improve the tauopathy in mouse models. *J. Biol. Chem.* **288**, 22042–22056 (2013).
131. Chou, K. C., Watenpaugh, K. D. & Heinrikson, R. L. A model of the complex between cyclin-dependent kinase 5 and the activation domain of neuronal Cdk5 activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 420–8 (1999).
132. Bisacchi, G. S. & Hale, M. R. A 'Double-Edged' Scaffold: Antitumor Power within the Antibacterial Quinolone. *Curr. Med. Chem.* **23**, 520–77 (2016).
133. Manske, R. H. The Chemistry of Quinolines. *Chem. Rev.* **30**, 113–144 (1942).
134. Skraup, Z. H. & Vorläufige, M. Eine Synthese des Chinolins. at <http://www.zobodat.at/pdf/SBAWW_81_2_0593-0595.pdf>
135. Wang, Z. in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents* (John Wiley & Sons, Inc., 2010). doi:10.1002/9780470638859.conrr588
136. Madrid, P. B. *et al.* Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**, (2005).
137. Wu, Y. C., Liu, L., Li, H. J., Wang, D. & Chen, Y. J. Skraup-Doebner-Von Miller quinoline synthesis revisited: Reversal of the regiochemistry for γ -aryl- β , γ -unsaturated α -ketoesters. *J. Org. Chem.* **71**, 6592–6595 (2006).
138. Kouznetsov, V., Mendez, L. & Gomez, C. Recent Progress in the Synthesis of Quinolines. *Curr. Org. Chem.* **9**, 141–161 (2005).
139. Cheng, C.-C., Yan, S.-J., Cheng, C. & Yan, S. in *Organic Reactions* 37–201 (John Wiley & Sons, Inc., 1982). doi:10.1002/0471264180.or028.02
140. Buu-Hoi, N. P., Royer, R., Xuong, N. D. & Jacquignon, P. The Pfitzinger Reaction in the Synthesis of Quinoline Derivatives. *J. Org. Chem.* **18**, 1209–1224 (1953).
141. Shvehkgeimer, M. G.-A. The Pfitzinger Reaction. (Review). *Chem. Heterocycl. Compd.* **40**, 257–294 (2004).
142. Li, J. J. *Name Reactions*. Springer International Publishing (2014). doi:10.1007/978-3-319-03979-4
143. Yamashkin, S. A., Yudin, L. G. & Kost, A. N. Closure of the pyridine ring in the combes quinoline synthesis (Review). *Chem. Heterocycl. Compd.* **28**, 845–855 (1992).
144. Domingo, L. R. *et al.* Understanding the mechanism of the Povarov reaction. A DFT study. *RSC Adv.* **4**, 25268 (2014).
145. Khusnutdinov, R. I., Bayguzina, A. R. & Dzhemilev, U. M. Metal complex catalysis in the synthesis of quinolines. *J. Organomet. Chem.* **768**, 75–114 (2014).
146. Ramann, G. & Cowen, B. Recent Advances in Metal-Free Quinoline Synthesis. *Molecules* **21**, (2016).
147. Surat, M. a., Jauhari, S. & Desak, K. R. A brief review : Microwave assisted organic reaction. *Appl. Sci. Res.* **4**, 645–661 (2012).

148. Găină, L. *et al.* Microwave-Assisted Synthesis of Phenothiazine and Quinoline Derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* **8**, 70–80 (2007).
149. Muscia, G. C., Bollini, M., Carnevale, J. P., Bruno, A. M. & Asís, S. E. Microwave-assisted Friedländer synthesis of quinolines derivatives as potential antiparasitic agents. *Tetrahedron Lett.* **47**, 8811–8815 (2006).
150. Majumder, A., Gupta, R. & Jain, A. Microwave-assisted synthesis of nitrogen-containing heterocycles. *Green Chem. Lett. Rev.* **6**, 151–182 (2013).
151. Arya, K. & Agarwal, M. Microwave prompted multigram synthesis, structural determination, and photo-antiproliferative activity of fluorinated 4-hydroxyquinolinones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 86–93 (2007).
152. Chatterjee, A., Cutler, S. J., Khan, I. A. & Williamson, J. S. Efficient synthesis of 4-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2- c c]quinoline-2-carboxylic acid derivatives from aniline. *Mol. Divers.* **18**, 51–59 (2014).
153. Patil, N. T. & Yamamoto, Y. Synthesis of cyclic alkenyl ethers via intramolecular cyclization of O-alkynylbenzaldehydes. Importance of combination between CuI catalyst and DMF. *J. Org. Chem.* **69**, 5139–5142 (2004).
154. Abdou, M. M. Chemistry of 4-Hydroxy-2(1H)-quinolone . Part 1: Synthesis and reactions. *Arab. J. Chem.* **10**, S3324–S3337 (2017).
155. Fiala, W. & Staldbauer, W. Nucleophilic Chlorination of 3-Formyl-4-hydroxyquinolin-2(1H)-ones. *J. für Prakt. Chemie* **335**, 128–134 (1993).
156. Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. & Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **62**, 7512–7515 (1997).
157. Brown, S. P., Dransfield, P., Du, X., Fu, Z. & Houze, J. Spirocyclic GPR40 modulators, US8748462B2. (2009).
158. Sechi, M. *et al.* Design and Synthesis of Bis-amide and Hydrazide-containing Derivatives of Malonic Acid as Potential HIV-1 Integrase Inhibitors. *Molecules* **13**, 2442–2461 (2008).
159. Sciarretta, C. & Minichiello, L. in *Methods in Molecular Biology - Mouse Cell Culture - Methods and Protocols* (eds. Ward, A. & Tosh, D.) 221–231 (Humana Press Inc, 2010). doi:10.1007/978-1-59745-019-5
160. Pfister, K. K. *The neuronal cytoskeleton, motor proteins, and organelle trafficking in the axon.* at <[https://books.google.pt/books?id=WQHSBgAAQBAJ&pg=PA40&lpg=PA40&dq=why+do+you+replace+only+half+culture+medium+in+neuronal+cultures&source=bl&ots=eztTnp3lvK&sig=7wSdbAuoggYKyRyxIAH-e8nTQCs&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwirw7yn25_WAhVEPRQKH8wBgsQ6AEISDAE#v=onepage&q=why do you replace only half culture medium in neuronal cultures&f=false](https://books.google.pt/books?id=WQHSBgAAQBAJ&pg=PA40&lpg=PA40&dq=why+do+you+replace+only+half+culture+medium+in+neuronal+cultures&source=bl&ots=eztTnp3lvK&sig=7wSdbAuoggYKyRyxIAH-e8nTQCs&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwirw7yn25_WAhVEPRQKH8wBgsQ6AEISDAE#v=onepage&q=why%20do%20you%20replace%20only%20half%20culture%20medium%20in%20neuronal%20cultures&f=false)>
161. Harkany, T. *et al.* β -Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 2735–2745 (2000).
162. Lopez-Tobón, A., Cepeda-Prado, E. & Cardona-Gómez, G. P. Decrease of Tau Hyperphosphorylation by 17 β Estradiol Requires Sphingosine Kinase in a Glutamate Toxicity Model. *Neurochem. Res.* **34**, 2206–2214 (2009).
163. Posada-Duque, R. A., López-Tobón, A., Piedrahita, D., González-Billault, C. & Cardona-Gomez, G. P. p35 and Rac1 underlie the neuroprotection and cognitive improvement induced by CDK5 silencing. *J. Neurochem.* **134**, 354–370 (2015).
164. Ansari, M. F. *et al.* *New antiprotozoal agents: Synthesis and biological evaluation of different 4-(7-chloroquinolin-4-yl) piperazin-1-yl)pyrrolidin-2-yl)methanone*

- derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **27**, (2017).
165. Dow, G. S. *et al.* The antimalarial potential of 4-quinolinecarbinolamines may be limited due to neurotoxicity and cross-resistance in mefloquine-resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2624–32 (2004).
 166. Sanders, N. G., Meyers, D. J. & Sullivan, D. J. Antimalarial efficacy of hydroxyethylapoquinine (SN-119) and its derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 820–7 (2014).
 167. Golden, E. B. *et al.* Quinoline-based antimalarial drugs: a novel class of autophagy inhibitors. *Neurosurg. Focus* **38**, (2015).
 168. Riss, T. L. *et al.* *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual* (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>>
 169. Johnson, M. Protein Quantitation. *Mater. Methods* **2**, (2012).
 170. Noble, J. E. & Bailey, M. J. A. *Chapter 8 Quantitation of Protein. Methods in Enzymology* **463**, (Elsevier Inc., 2009).
 171. Walker, J. M. in *Protein Protocols Handbook, The* 11–14 (Humana Press, 2002). doi:10.1385/1-59259-169-8:11

VIII. ANEXOS

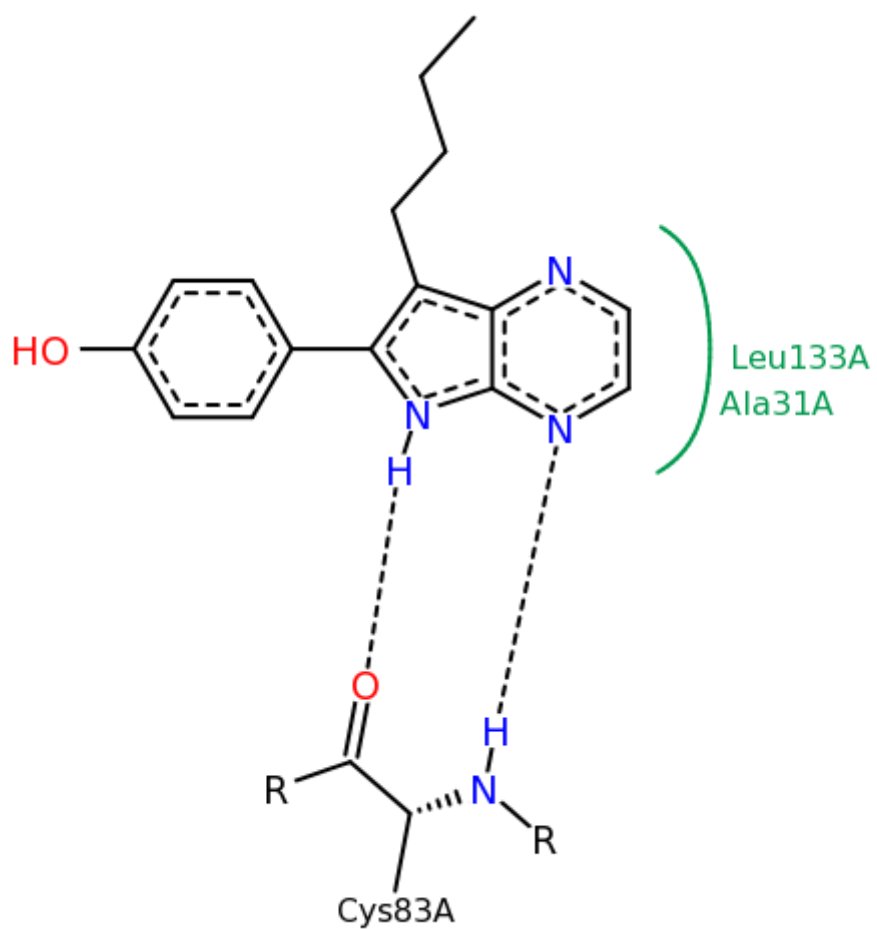


Figura VIII-1. Representação do modelo farmacofórico virtual estabelecido para o inibidor do complexo CDK5-p25 aloisina A (Identificação na base de dados PDB: 1UNH).

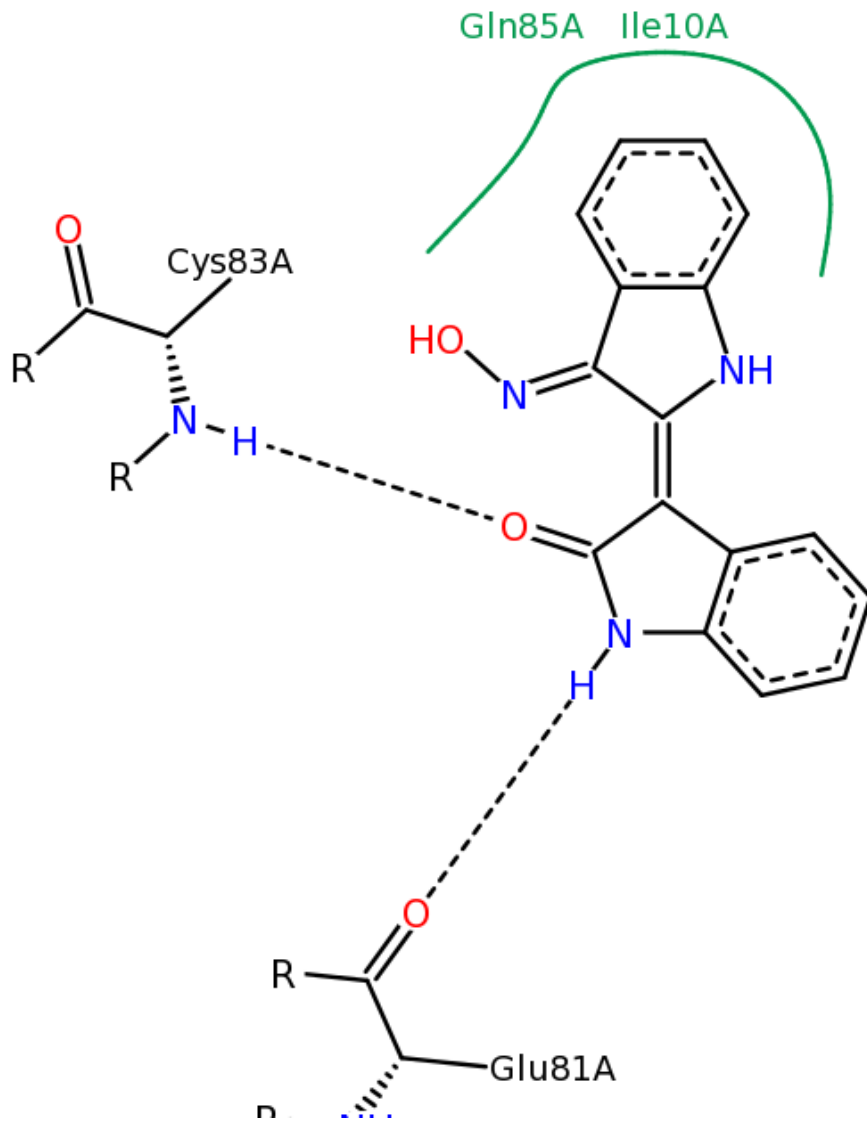


Figura VIII-2. Representação do modelo farmacofórico virtual estabelecido para o inibidor do complexo CDK5-p25 indirubina-3-monoxima (Identificação na base de dados PDB: 1UNG).

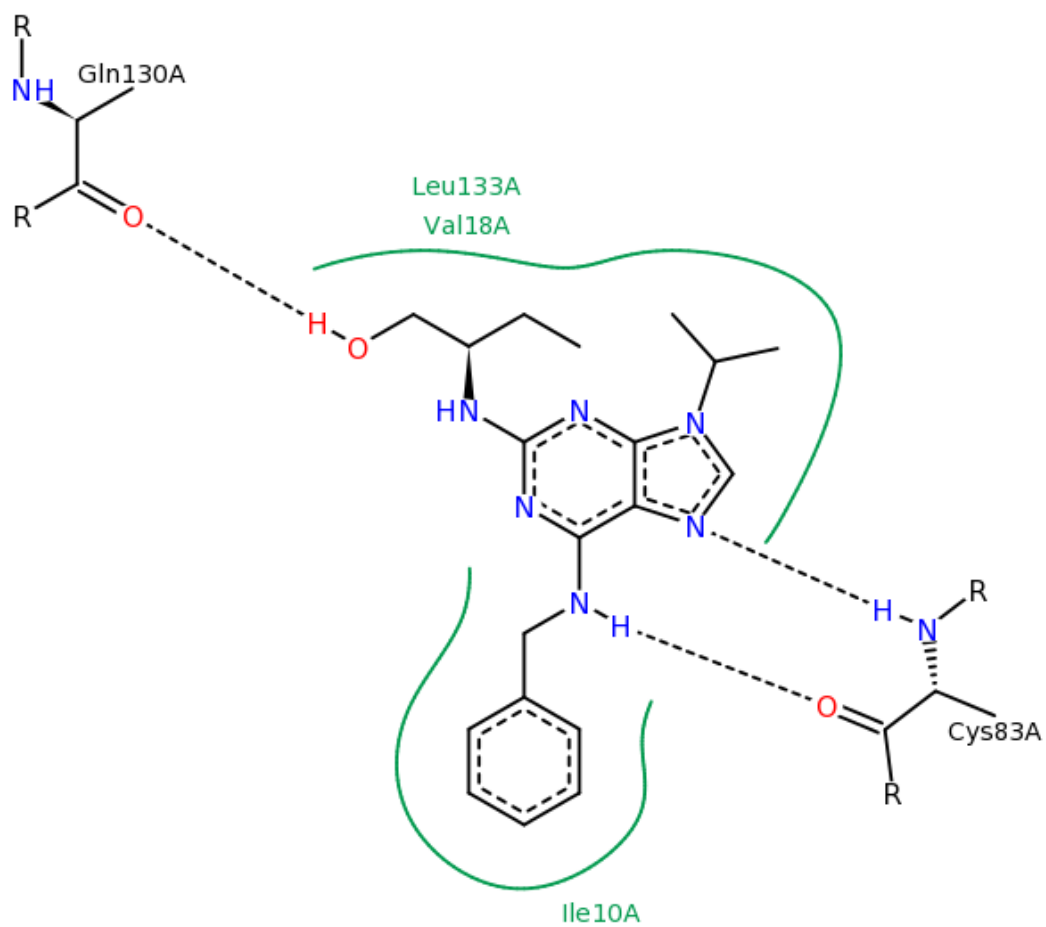


Figura VIII-3. Representação do modelo farmacofórico virtual estabelecido para o inibidor do complexo CDK5-p25 R-roscovitina (Identificação na base de dados PDB: 1UNL).

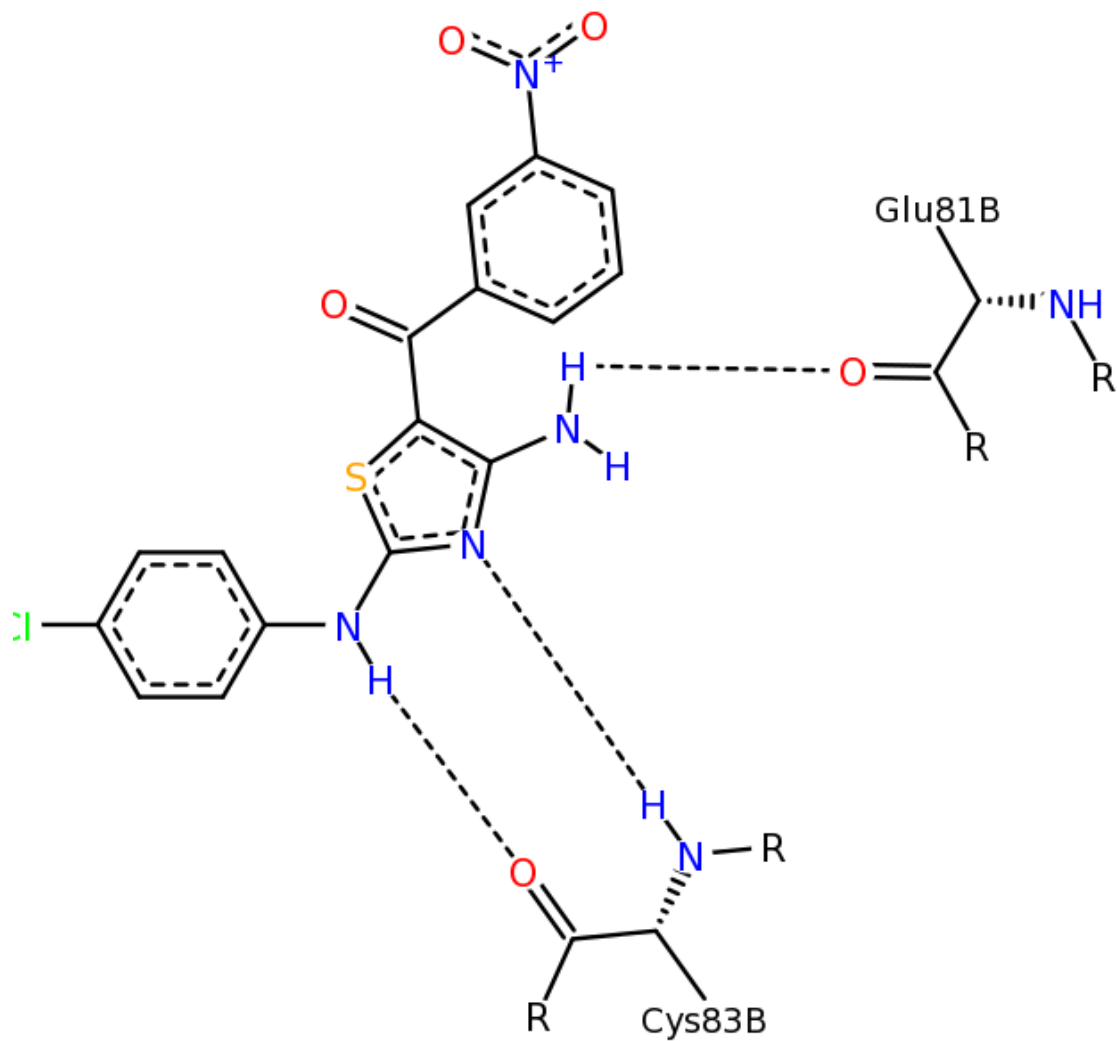


Figura VIII-4. Representação do modelo farmacofórico virtual estabelecido para o inibidor do complexo CDK5-p25 diaminotiazole (Identificação na base de dados PDB: 300G).

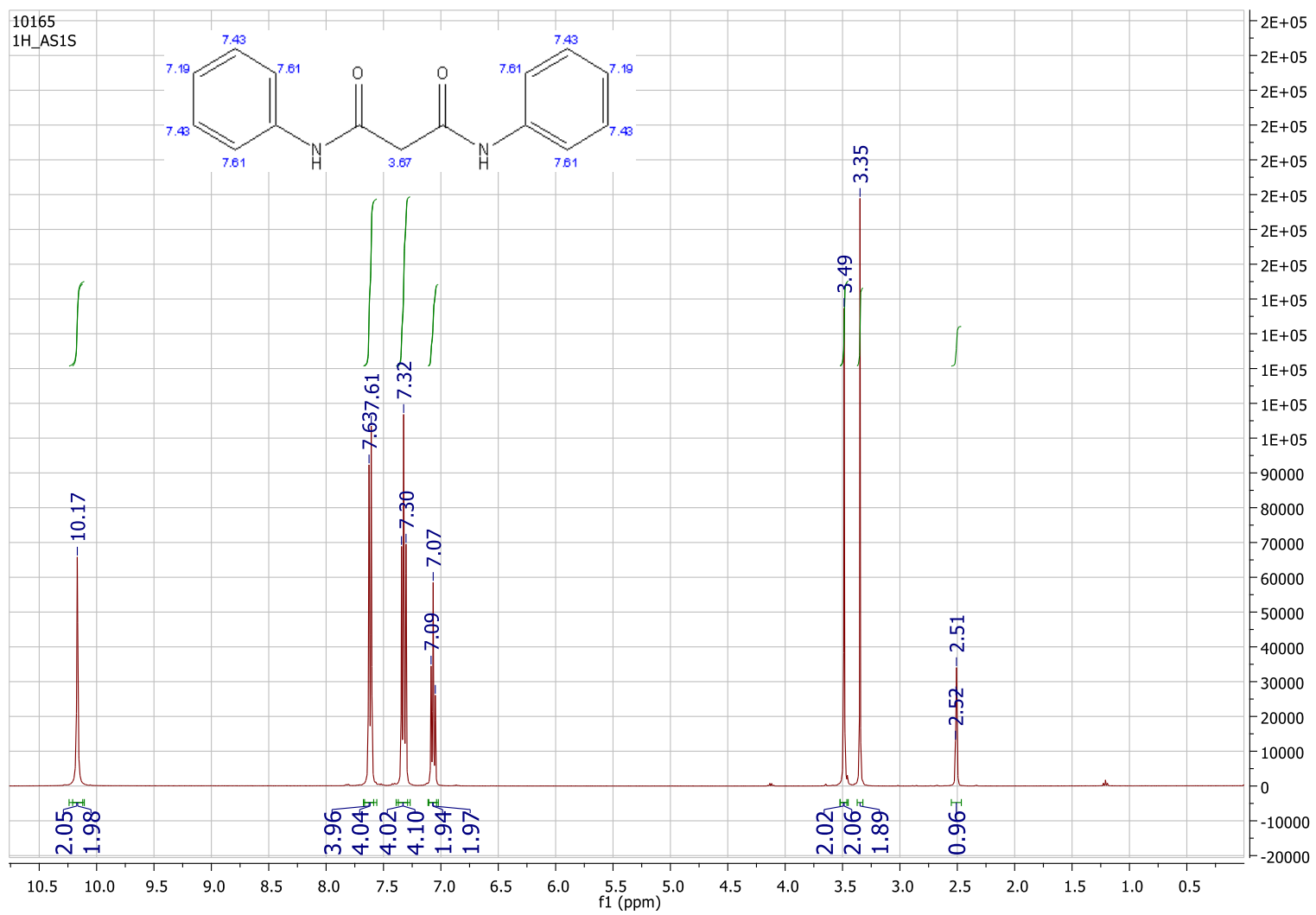


Figura VIII-5. Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto (1), AS1S.

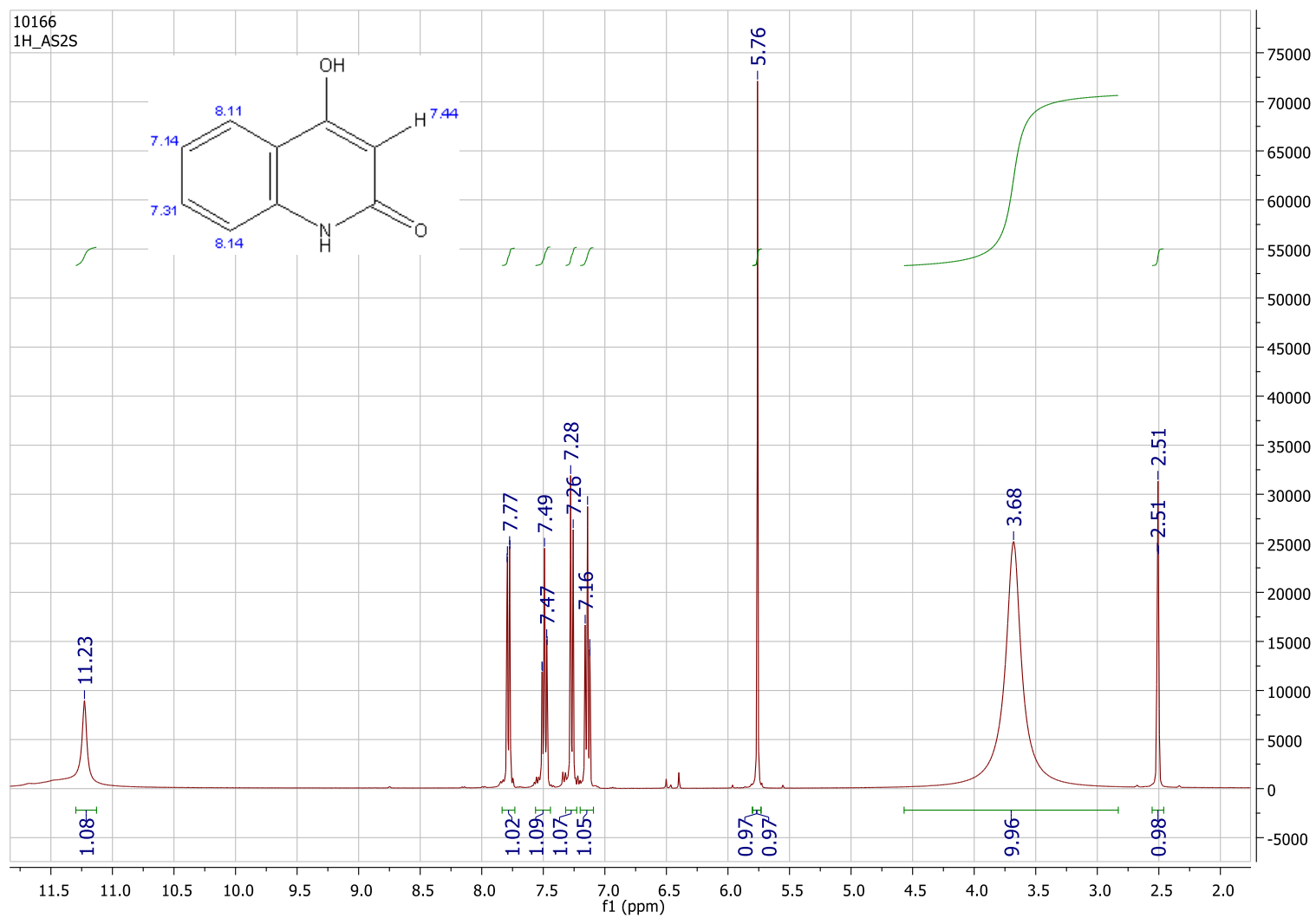


Figura VIII-6. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto (2), AS2S.

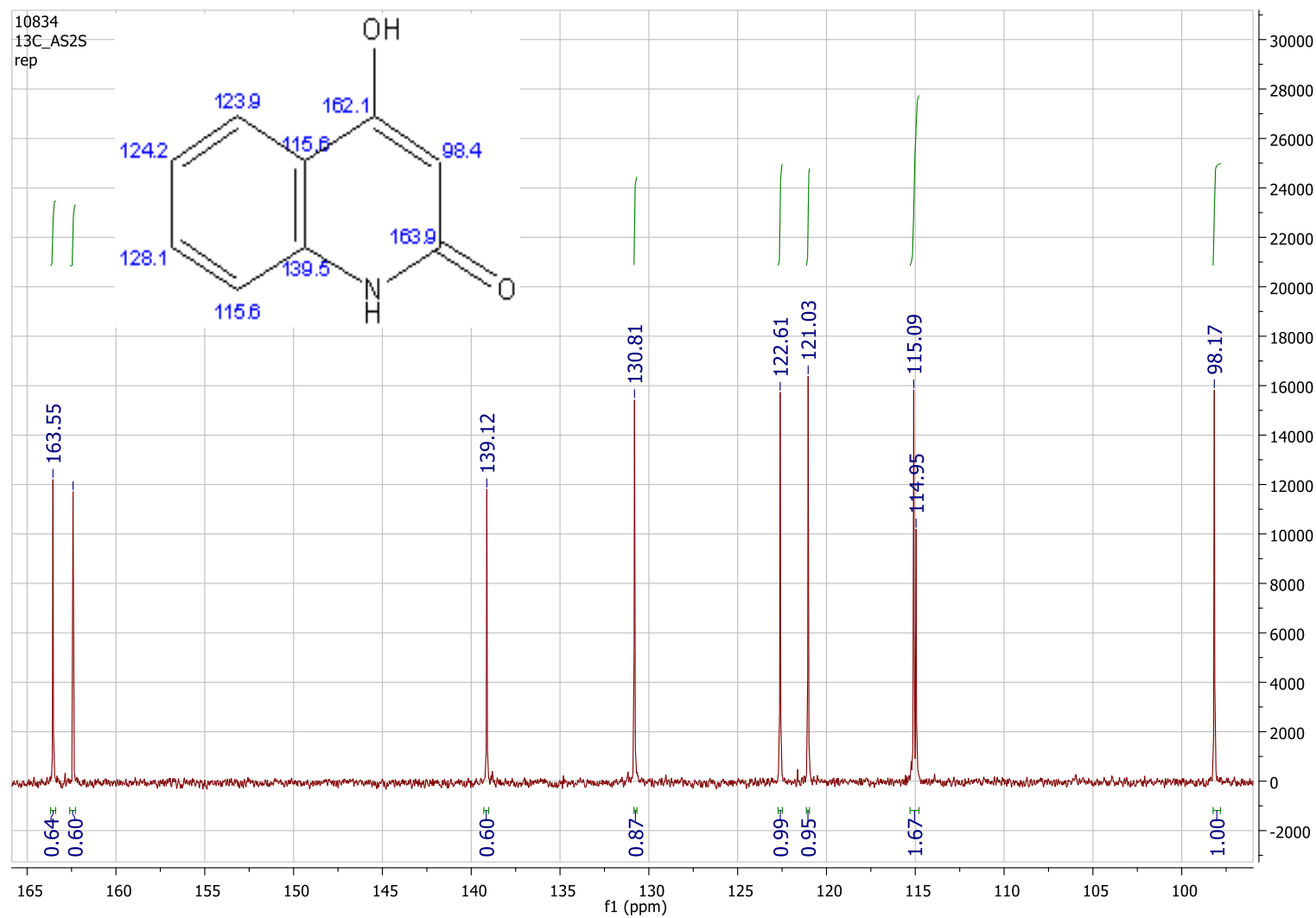


Figura VIII-7. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto (2), AS2S.

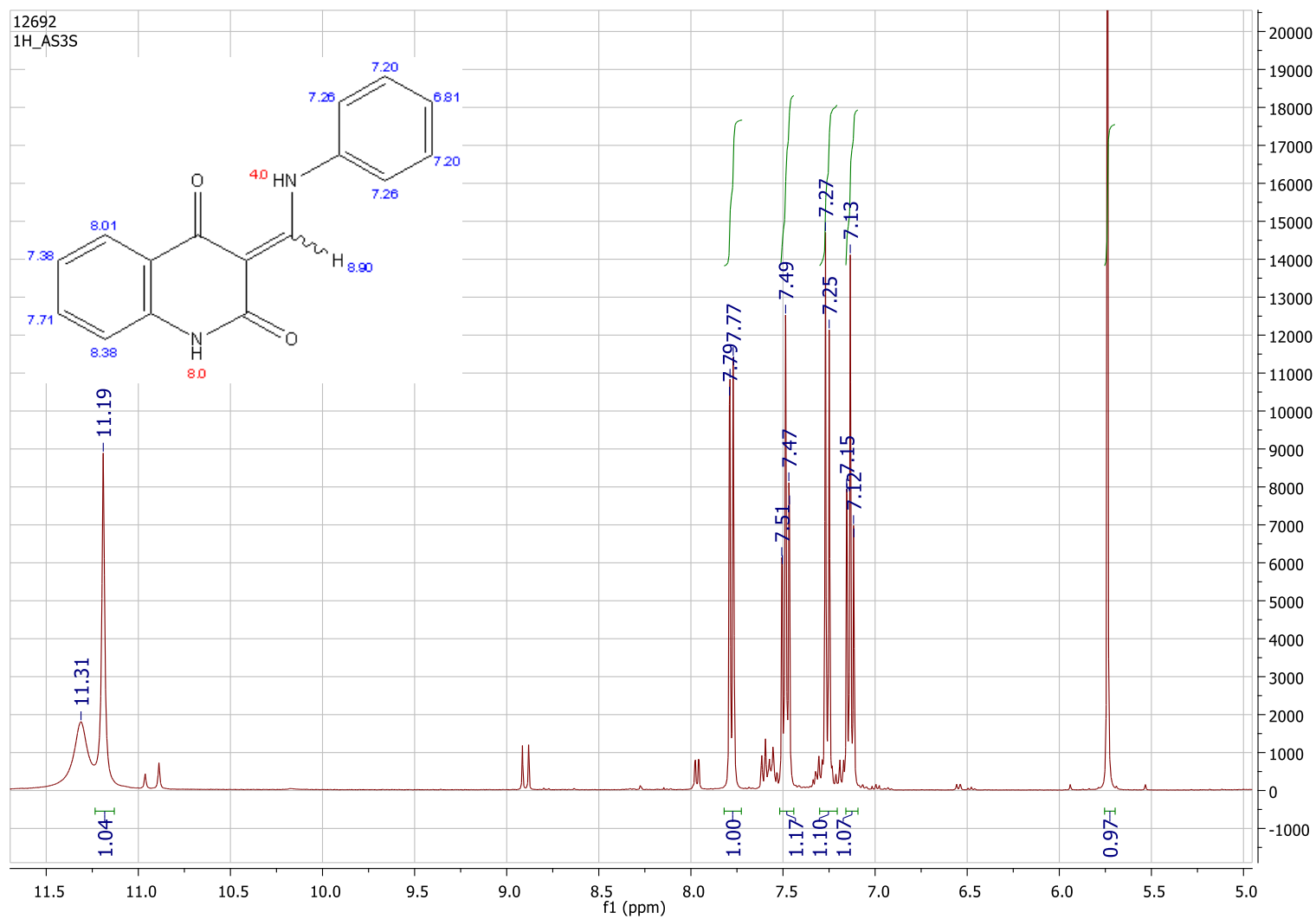


Figura VIII-8. Espectro de ^1H -RMN obtido para o composto (3), AS3S.

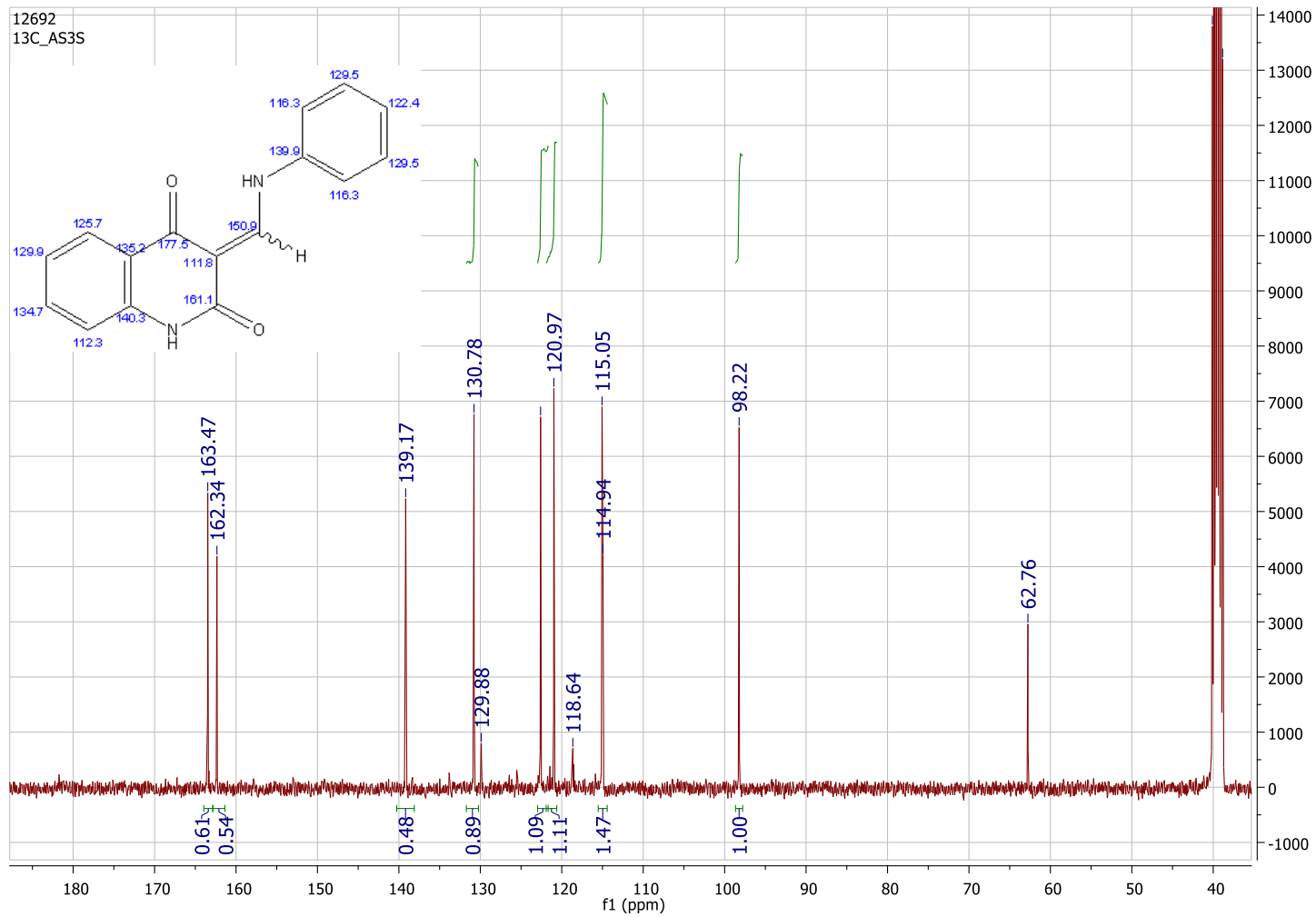


Figura VIII-9. Espectro de ^{13}C -RMN obtido para o composto (3), AS3S.