

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**ESTUDO DA INIBIÇÃO DA MONOAMINA OXIDASE POR NOVOS  
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE CUMARINA.**

**LIN MACHADO DE LIMA**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA INIBIÇÃO DA MONOAMINA OXIDASE POR  
NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DA CUMARINA**

**LIN MACHADO DE LIMA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Cristiane Martins Cardoso**

*e Coorientação do Professor*  
**Frederico Freire Bastos**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção de grau **Mestre em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química.

Seropédica, RJ  
Julho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**LIN MACHADO DE LIMA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,  
no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ----/----/-----

---

Professora D.Sc. Cristiane Martins Cardoso - UFRRJ  
(Orientadora)

---

Professor D.Sc. André Luiz Gomes Vieira – IQ/UFRRJ

---

Professora D.Sc. Daniele Corrêa Fernandes – DBq/IBRAG/UERJ

---

Professor D.Sc. André Marques dos Santos – IQ/UFRRJ

---

Professor D.Sc. Jayme da Cunha Bastos Neto - DBq/IBRAG/UERJ

Dedico este trabalho a todos que querem um mundo  
melhor, sem guerras, sem violência, sem doenças,  
sem preconceitos mas, com tolerância, igualdade,  
respeito e amor ao próximo.

## AGRADECIMENTOS

A minha saudosa amiga Odete Terezinha Martins Cardoso (in memoriam) que sempre me incentivou e cobrou esse mestrado.

Ao meu saudoso amigo Roosevelt Aguiar Dias (in memoriam) pelo conhecimento, admiração, sabedoria e também pelos momentos de descontração.

Aos amigos Paulo Roberto, Carlos Roberto, Gustavo Laranja pela ajuda e apoio em vários momentos e pelos almoços pelo bairro de Vila Isabel.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Química, pelo conhecimento adquirido.

Aos professores Vera Lúcia Freire Bastos e Jayme da Cunha Bastos Neto pelo incentivo e por permitirem a realização dos experimentos no Laboratório de Bioquímica Toxicológica do Departamento de Bioquímica da UERJ, do qual são responsáveis.

Ao Prof. Dr. Arthur Eugen Kummerle por ceder gentilmente as amostras a serem testadas.

A professora Cristiane Martins Cardoso pela orientação e a todos os integrantes do seu Laboratório.

Ao professor Frederico Freire Bastos pela coorientação.

Ao meu filho Victor Araujo Lima, que iniciou há pouco sua jornada na graduação em engenharia mecânica; que lhe sirva como incentivo.

À minha esposa Idenise Graça de Araujo lima, por sempre me incentivar e entender minhas escolhas.

À minha mãe Elizabeth Machado de Lima e meus irmãos Hajji e William Machado de Lima pelo apoio incondicional.

Ao meu pai Antônio Augusto de Souza Lima (in memoriam).

A CAPES agência de fomento à pesquisa pelo financiamento deste trabalho.

E, principalmente, agradeço a Deus, que me guiou, me deu forças e sabedoria para alcançar todos os meus objetivos. Obrigado, meu Deus, por se fazer presente na minha vida!

## RESUMO

LIMA, Lin Machado. **Estudo da inibição da monoamina oxidase por novos compostos sintéticos derivados de cumarina**. 2019. 38p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A monoamina oxidase [EC 1.4.3.4 (MAO)] é uma enzima localizada na membrana externa da mitocôndria que usa a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como cofator enzimático para catalisar a conversão oxidante de uma amina em seu aldeído correspondente, produzindo também amônia e peróxido de hidrogênio. A atividade das monoamina oxidases regula os níveis de aminas biogênicas presentes nos tecidos, principalmente no cérebro. Monoamina oxidases existem como duas proteínas: MAO-A e MAO-B. Estas isoformas foram definidas primariamente pelas afinidades por substratos e sensibilidade aos inibidores. Assim, a MAO-A oxida preferencialmente serotonina, melatonina, noradrenalina e adrenalina. A MAO-B oxida preferencialmente a feniletilamina, um alcaloide do metabolismo da fenilalanina. A ingestão de feniletilamina promove a liberação de dopamina que atua no cérebro estimulando euforia. Com relação aos inibidores, a MAO-A é inibida preferencialmente por clorgilina. MAO-B é inibida por deprenil e por pargilina. Esses inibidores podem ser usados para o tratamento das doenças degenerativas do cérebro. Desde que estudos têm mostrado que moléculas derivadas de cumarinas obtiveram excelentes resultados como inibidoras destas enzimas, muitas drogas novas derivadas da cumarina vêm sendo sintetizadas, das quais algumas são muito promissoras para o tratamento das doenças de Alzheimer e Parkinson. O alvo desse trabalho foi promover testes de inibição *in vitro* da MAO da fração mitocondrial de cérebro de rato Wistar com novos produtos derivados da cumarina. Dentre os compostos testados, dois deles se mostraram promissores como inibidores da MAO de fração mitocondrial de cérebro de rato wistar, atingindo mais de 60% de inibição da atividade da monoamina oxidase.

**Palavras-chave:** Monoamina oxidase. Cumarina. Inibidores de enzimas.

## ABSTRACT

LIMA, Lin Machado. **Study of the inhibition of monoamine oxidase by new synthetic compounds derived from coumarin**. 2019. 38p. Dissertation (Master Science in Chemistry). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Monoamine oxidase [EC 1.4.3.4 (MAO)] is an enzyme located in the outer membrane of the mitochondria, which uses flavin adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor to catalyze the oxidant conversion of an amine in its corresponding aldehyde, also producing ammonia and hydrogen peroxide. MAO activity regulates the levels of biogenic amines present in tissues, especially in the brain. MAO exists as two proteins: MAO-A and MAO-B. These isoforms were defined primarily by substrate affinities and inhibitor sensitivity. Accordingly, MAO-A oxidizes, preferably, serotonin, melatonin, noradrenaline and adrenaline. MAO-B preferably oxidizes phenylethylamine, an alkaloid from the metabolism of phenylalanine. The ingestion of phenylethylamine promotes the release of dopamine that acts in the brain stimulating euphoria. Concerning the inhibitors, MAO-A is preferentially inhibited by clorgiline. MAO-B is inhibited by deprenyl and pargyline. These inhibitors can be used in the treatment of degenerative brain diseases. Since studies have shown that molecules derived from coumarins achieved excellent results as inhibitors of these enzymes, several new drugs derived from coumarin have been synthesized, which a few are very promising in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. This study aimed to promote *in vitro* inhibition tests of MAO with new substances derived from coumarin. Among the compounds tested, two of them were shown to be promising as MAO inhibitors of mitochondrial fraction of wistar rat brain, reaching more than 60% inhibition of monoamine oxidase activity.

**Keywords:** Monoamine oxidase; Coumarin; Enzymes Inhibitors

## LISTA DE FIGURAS

Figura I - Estimativa do número de pessoas afetadas por demência entre 2010 e 2050 no mundo inteiro.

Figura II - Diferentes regiões do cérebro, com as áreas mais afetadas pela DA destacadas em vermelho.

Figura III - Diferença entre um neurônio saudável (A) e um de paciente com DA (B).

Figura IV - Possíveis conformações dos monômeros de A $\beta$  e suas diferentes formas de agregação.

Figura V - Reações de Harber – Weiss e de Fenton

Figura VI - Estrutura cristalina da MAO-B humana.

Figura VII - Síntese da dopamina e metabolismo pela MAO-A e MAO-B.

Figura VIII - Estrutura química de alguns inibidores da MAO.

Figura IX - Estrutura química da cumarina.

Figura X - Alguns derivados de cumarina com atividade inibitória contra MAO-B.

Figura XI - Compostos sintéticos para estudos de inibição da MAO.

Figura XII - Ensaio da atividade da monoamina oxidase com quinuramina como substrato.

Figura XIII - Curva Padrão de 4-HQ.

Figura XIV - Atividade da MAO em diferentes quantidades de proteína.

Figura XV - Atividade da MAO na presença do inibidor clorgilina nas concentrações de  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>.

$10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>.

Figura XVII - (A) “Screening” da atividade da MAO com possíveis inibidores (B) Percentual de inibição da atividade da MAO.

Figura XVIII - Determinação do IC<sub>50</sub> para os compostos G2C3 (A) e G3C3 (B).



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela I - % de inibição.

Tabela II - IC<sub>50</sub> de inibidores da MAO.

## **-LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

DA	doença de Alzheimer;
A $\beta$	proteína beta amiloide;
DC	disfunção cognitiva;
DMSO	dimetil-sulfóxido;
FAD	flavina adenina dinucleotídeo;
G	aceleração da gravidade;
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio;
DH	doença de Huntington;
IC <sub>50</sub>	concentração do inibidor que inibe 50% da atividade enzimática;
MAO-A	monoamina oxidase tipo A;
MAO-B	monoamina oxidase tipo B;
DN	doenças neurodegenerativas;
DP	doença de Parkinson;
$\beta$ PP	proteína precursora da proteína beta amiloide;
IMAO	inibidor da monoamina oxidase;

## SUMÁRIO

### **1 INTRODUÇÃO**

1

1.1 Doenças Neurodegenerativas	1
1.2 A Neurodegeneração e a Doença de Alzheimer	2
1.2.1 Bases Moleculares da Doença de Alzheimer	3
1.2.2 A Hipótese Colinérgica	3
1.2.3 A Hipótese da Disfunção Glutamatérgica	3
1.2.4 A Hipótese da Cascata Amilóide	4
1.2.5 O Papel da Proteína TAU: Possivelmente uma consequência	7
1.2.6 A Hipótese Metálica	7

<b>2 -MONOAMINA OXIDASE COMO ALVO TERAPÊUTICO</b>	<b>8</b>
---	----------

<b>3 -JUSTIFICATIVA</b>	<b>13</b>
-------------------------	-----------

<b>4 OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
--------------------	-----------

4.1 Objetivos Gerais	14
4.2 Objetivos Específicos	14

<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
-----------------------------	-----------

5.1 Obtenção dos Compostos Sintéticos	15
5.2 Animais Utilizados no Estudo	15
5.3 Preparo da Fração Mitocondrial Cerebral	16
5.4 Determinação de Proteínas	16
5.5 Determinação da Atividade da MAO	17
5.6 Gráficos e Análises Estatísticas	18

<b>6 RESULTADOS</b>	<b>19</b>
---------------------	-----------

<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>24</b>
--------------------	-----------

<b>8 CONCLUSÃO</b>	<b>25</b>
--------------------	-----------

<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>26</b>
-------------------------------------	-----------



## 1. INTRODUÇÃO

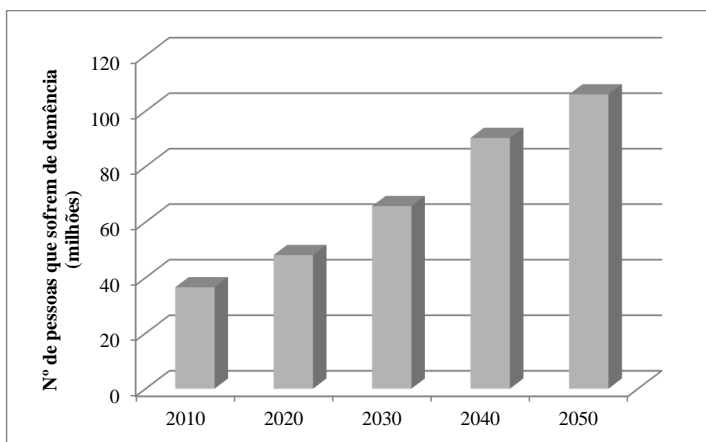
### 1.1. Doenças Neurodegenerativas

De acordo com o E.U. Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research<sup>1</sup>, as doenças neurodegenerativas são condições debilitantes e incuráveis, que resultam na degeneração progressiva e/ou na morte das células nervosas.

Os neurônios são a unidade-base do sistema nervoso (cérebro e medula espinhal). Normalmente os neurônios não se reproduzem nem se substituem e, desta forma, quando sofrem lesões ou morrem não podem ser regenerados. A degradação dos neurônios causa problemas com o movimento, as ataxias, ou com o funcionamento cerebral, originando a demência.

A demência é um declínio progressivo ou crônico da função cognitiva, que afeta a memória, o pensamento, o comportamento, a linguagem, a capacidade de cálculo, a aprendizagem e a emoção; não devendo nunca ser associada a um processo normal de envelhecimento. Dentre as demências, podemos salientar a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP), a doença de Pick, a demência vascular, a doença de Creutzfeldt-Jacob ou doença de Huntington<sup>2</sup>.

Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (Abraz)<sup>4</sup>, cerca de 20 milhões de brasileiros têm mais de 60 anos de idade (IBGE, 2010) e 6% deles sofrem da doença, o que a torna a demência mais comum. Com o envelhecimento populacional, aumenta o número de casos em todo o mundo e estima-se que 44 milhões de pessoas atualmente são portadores dela. Em 2050, pode chegar a 106 milhões, quando a faixa etária de maior risco, após os 65 anos, representará 22% da população mundial<sup>4</sup>. Nos Estados Unidos, é a quarta principal causa de morte de idosos entre 75 e 80 anos – atrás apenas do infarto, do derrame e do câncer (Figura I).



**Figura I-** Estimativa do número de pessoas afetadas por demência entre os anos de 2010 e 2050 no mundo inteiro. [Fonte: Elaboração própria a partir dos dados disponíveis em (World Health Organization, 2012) & (Alzheimer’s Disease International, 2009) & (IBGE, 2010)].

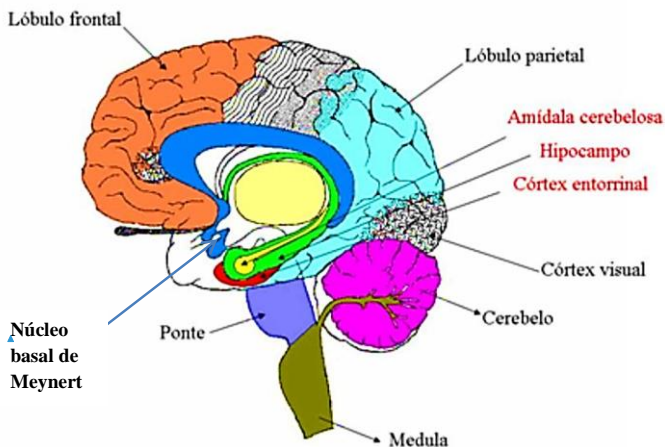
## 1.2. A Neurodegeneração e a Doença de Alzheimer

A neurodegeneração é um dos processos bioquímicos progressivos do sistema nervoso. A desregulação desses processos leva a diferentes doenças neurodegenerativas (ND). Estas patologias influenciam severamente a qualidade de vida dos idosos. A doença de Alzheimer é uma doença degenerativa progressiva, descrita em 1906 pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Dr. Alois Alzheimer (1864-1915) <sup>54,60</sup>. Esta doença é responsável pela maioria dos casos de demência (60 a 80% dos casos) mundial <sup>2</sup>.

No decurso da doença de Alzheimer várias mudanças bioquímicas são observadas em seres humanos com doença de Alzheimer. Sua causa não é totalmente compreendida, mas vários fatores de risco são identificados, incluindo fatores ambientais, genéticos e a idade. Existem várias hipóteses sobre a evolução desta doença, incluindo diferentes mecanismos, como estresse oxidante, inflamação, disfunção mitocondrial e estresse proteolítico <sup>52</sup>.

Os dados neuropatológicos mais relevantes em pacientes da DA são a presença de atrofia cortical difusa, degeneração neurovascular, perdas neuronais e sinápticas envolvendo vários sistemas de neurotransmissão, presença de placas senis extracelulares compostas de agregados filamentosos da proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) e massas neurofibrilares intracelulares, formadas principalmente pela proteína tau <sup>72</sup>. Apesar de ser possível a presença destas alterações no cérebro de idosos saudáveis, os sintomas não são observados conjuntamente e nem com a mesma intensidade que em pacientes acometidos pela DA <sup>73</sup>. O falecimento costuma ocorrer entre 6 e 12 anos após o início da doença, normalmente por uma complicação da imobilidade ou por embolia pulmonar e pneumonia <sup>37</sup>.

As placas extracelulares e as massas intracelulares presentes no cérebro dos humanos acometidos por DA estão localizadas, sobretudo, nas amígdalas cerebelosas, no hipocampo e no córtex entorrinal do lóbulo temporal, enquanto as porções parietais e frontais do córtex associativo são menos afetadas <sup>72</sup>. A Figura II mostra um esquema das diferentes regiões do cérebro, com as áreas mais afetadas pela DA em destaque.



**Figura II**–Diferentes regiões do cérebro, com as áreas mais afetadas pela DA destacadas em vermelho.

### **12.2.1.1.2.1. Bases Moleculares da Doença de Alzheimer**

Diferentes hipóteses a respeito das bases moleculares da DA têm sido levantadas. A teoria mais antiga é representada pela hipótese colinérgica, postulada no início da década de 80. Já na metade dessa década, há o surgimento da hipótese glutamatérgica. A hipótese da "cascata amiloide" foi primeiramente proposta em 1992. Outras conjecturas como as hipóteses oligomérica e metálica, podem ser consideradas extensões da hipótese amiloide e começaram a tomar maiores importância durante a década de 90. A hipótese mais recentemente postulada correlaciona a DA com o diabetes, originando o termo "diabetes de tipo 3"<sup>19</sup>.

### **12.2.2.1.2.2. A Hipótese Colinérgica**

A hipótese mais antiga sobre a DA foi introduzida no início da década de 80, e descrita como a hipótese colinérgica na disfunção amnésica do idoso<sup>9,15</sup>. A importância da função colinérgica nos processos de aprendizagem e memória é conhecida desde o início da década de 70<sup>21</sup>, e as pesquisas a respeito da importância do sistema colinérgico na DA demonstraram diversas características, como a diminuição na concentração da colina acetiltransferase (ChAT), enzima responsável pela síntese da acetilcolina (ACh), no córtex e no hipocampo, assim como uma redução variável dos neurônios colinérgicos localizados no núcleo basal de Meynert<sup>18,45</sup>. Uma observação pertinente foi a da associação positiva entre essas duas depleções e o grau de severidade do déficit cognitivo do paciente em vida<sup>45,82</sup>.

Estudos subsequentes demonstraram que a administração de substâncias colinomiméticas reduzia as dificuldades mnemônicas apresentadas por pessoas acometidas pela doença<sup>10,24</sup>.

Estudos realizados também investigaram os efeitos dos inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (AChE), a enzima responsável por catalisar a hidrólise da acetilcolina restante no espaço sináptico sobre a aprendizagem, bem como a relação entre os níveis cerebrais de AChE e o desempenho de cobaias em testes de reconhecimento espacial<sup>10,59</sup>. Estas pesquisas apontaram a melhora da aprendizagem devido à ativação do sistema colinérgico. A redução do desempenho de aprendizagem e da memória em diferentes modelos animais expostos à administração de antagonistas muscarínicos, a escopolamina, também corrobora estes dados<sup>11</sup>. Estudos farmacológicos em seres humanos têm mostrado que este tipo de substância impede a formação de novas memórias sem influenciar a reatuação de eventos do passado remoto<sup>40</sup>. Pelo contrário, as substâncias com ação colinomimética promovem a aquisição de novos traços de memória, tanto em seres humanos quanto em modelos animais. Isto demonstra a importância da ativação dos receptores colinérgicos no processo de fixação da memória. Recentemente, tem sido demonstrado que o antagonismo dos receptores nicotínicos e muscarínicos causam deterioração cognitiva, indicando que este processo pode ser governado pelo funcionamento de ambos os receptores, os quais seriam ativados na modulação dos processos amnésicos, interagindo reciprocamente<sup>30</sup>.

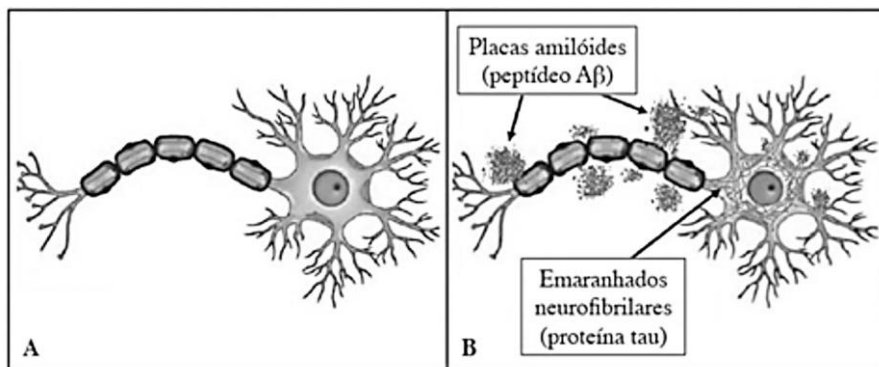
### **12.2.3.1.2.3. A Hipótese da Disfunção Glutamatérgica**

A hipótese glutamatérgica, conhecida também como "excito-tóxica", da DA também emergiu na década de 80<sup>31</sup>. O glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, tem sua atividade mediada por receptores de três tipos: os de *N*-metil-d-aspartato (NMDA), os de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e

os de cianato. A hipótese glutamatérgica prevê que, em condições específicas, tais como, a alteração do metabolismo energético celular, ocorre uma excessiva ativação de receptores de NMDA, podendo alterar a homeostase de cálcio, levando a um aumento das concentrações intracelulares deste metal, o que é capaz de iniciar o processo de apoptose (degeneração e morte) neuronal <sup>17,64</sup>. Os receptores de NMDA apresentam uma estrutura complexa, com diferentes sítios de ligação para o glutamato e diversos moduladores. A ativação fisiológica destes receptores gera, em nível neuronal, um fluxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Acredita-se que o glutamato liberado ative inicialmente os receptores de AMPA e de cianato, que, apesar da baixa afinidade, promoveriam a rápida despolarização da célula por meio da entrada de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . A entrada desses íons provocaria uma despolarização parcial da membrana plasmática, removendo o bloqueio exercido pelos íons  $\text{Mg}^{2+}$  dentro do canal do receptor de NMDA. Assim, o glutamato poderia ligar-se a uma subunidade deste receptor promovendo, em associação com a glicina ligada a outra subunidade, a entrada de mais  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  no neurônio, contribuindo para a sua excitabilidade <sup>22,77</sup>. Postula-se, portanto, que essa "excito-toxicidade" glutamato-dependente possa constituir um dos mecanismos patogênicos necessários para que o processo neurodegenerativo seja mantido e amplificado <sup>32</sup>.

#### 12.2.4.1.2.4. A Hipótese da Cascata Amiloide

Desde a descoberta da DA, é reconhecido que os sintomas da doença podem ser associados ao desenvolvimento de inúmeras lesões filamentosas intraneuronais e extracelulares no córtex límbico, assim como no córtex cerebral. Agregados anormais de fibras citoplasmáticas ocorrem tanto nos corpos celulares neuronais, envolvendo os emaranhados neurofibrilares, quanto nos axônios e dendritos. Estes sintomas são chamados coletivamente de neurites distróficas. Juntamente com a presença das neurites distróficas, há também outro importante sinal histopatológico na DA: a difundida presença de placas e agregados, formados principalmente pelo peptídeo  $\text{A}\beta$ , na porção extracelular do tecido cerebral <sup>61,71</sup>. A Figura III apresenta, esquematicamente, as diferenças entre um neurônio saudável e um neurônio característico de um paciente com DA.



**Figura III** - Diferenças entre um neurônio saudável (A) e um neurônio de um paciente com DA (B).

Embora deposições de origem amiloide (peptídeo  $\text{A}\beta$ ) possam ser também detectadas em pequenas quantidades em cérebros de idosos saudáveis, a produção deste tipo de peptídeo é

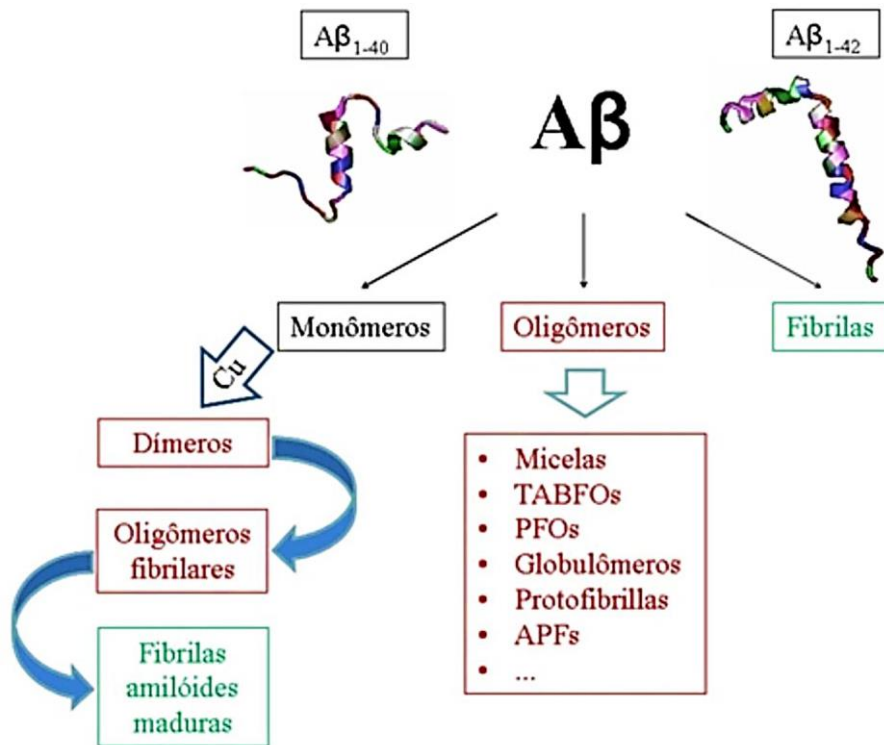


considerada central na patologia da DA. O trabalho que pela primeira vez propôs a sequência de eventos denominada "hipótese da cascata amiloide" foi publicado no início da década de 90 e postula que o peptídeo A $\beta$  e/ou os produtos de clivagem da sua proteína precursora, uma glicoproteína integral denominada proteína precursora amiloide (APP), são neurotóxicos e podem levar à formação das placas senis, resultando em morte celular<sup>38</sup>. Neste contexto, tem se associado o fato de que pacientes com trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down) apresentam depósitos do peptídeo A $\beta$  no final da infância ou no início da idade adulta e, posteriormente, desenvolvem as características neuropatológicas clássicas da DA, quando atingem por volta de quarenta anos, devido à localização do gene que codifica a APP, justamente no cromossomo 21<sup>28,44</sup>. Esta constatação conduziu a uma procura específica por famílias com autossomia dominante de DA que tivessem ligação genética com o cromossomo 21, resultando assim na identificação de seis diferentes mutações, sendo cinco associadas à FAD<sup>13,29,42,58</sup>, e uma associada à síndrome da hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo holandês<sup>50</sup>.

A formação do peptídeo A $\beta$ , composto de 39-42 aminoácidos, é o resultado da digestão da APP, que aparenta ter função fisiológica fundamental com relação aos fenômenos de neuroplasticidade<sup>39,53</sup>. Observou-se que diversos fragmentos com funções fisiológicas e fisiopatológicas são gerados a partir dessa proteína precursora<sup>14,53,71</sup>. Duas secretases, a  $\gamma$ -secretase e a  $\beta$ -secretase, clivam a APP em diferentes lugares, originando fragmentos de A $\beta$  de diferentes tamanhos, com 40 e 42 resíduos, respectivamente, A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Apesar de o primeiro fragmento ser o mais comum, atualmente considera-se que o segundo, mais hidrofóbico, possui um maior potencial amiloidogênico, embora ambos sejam capazes de se agregar e originar protofibrilas, fibrilas e, por fim, placas insolúveis<sup>75</sup>.

Diferentes estudos têm apontado para a correlação entre mutações de APP e  $\gamma$ -secretase e algumas formas raras de DA familiar.<sup>13,14,25,29,34,42</sup> Diversos modelos animais da doença corroboram este achado, pois apresenta uma superexpressão de  $\beta$ -APP e presenilina, proteína enzimática de membrana responsável pela regulação das  $\gamma$ -secretases<sup>76</sup>.

Diferentes formas do peptídeo A $\beta$  foram identificadas, com funções e propriedades específicas<sup>41,67</sup>. A $\beta$  solúvel, por exemplo, foi identificado na metade da década de 90 a partir de frações solúveis retiradas do córtex cerebral de pacientes com DA, aparentando ser a primeira forma de acúmulo do peptídeo<sup>78</sup>. O peptídeo A $\beta$  pode ser encontrado na forma de monômeros e em estruturas compostas por dímeros e trímeros, formando as denominadas arquiteturas "monoméricas" ou "oligoméricas", enquanto as "protofibrilas" representam as estruturas de ordem intermediária entre os agregados mencionados e as fibrilas presentes nas placas senis<sup>27</sup>. O termo oligômero caracteriza um amplo grupo de agregados não fibrilares. Entre as espécies identificadas como oligômeros incluem-se, como mostrado esquematicamente na Figura IV, agregados desordenados, micelas, protofibrilas, agregados pré-fibrilares, oligômeros fibrilares tóxicos de A $\beta$  TABFOs - do inglês, *Toxic Amyloid-Beta Fibrillar Oligomers*, ligantes amiloides difusíveis, oligômeros pré-fibrilares PFOs - do inglês, *Pre-fibrillar Oligomers*, globulômeros e protofibrilas anulares APFs - do inglês, *Annular Protofibrils*, que agem como canais de íons Ca<sup>2+</sup>, afetando a homeostase celular e proporcionando uma explicação biofísica direta para o mecanismo subjacente a certos sintomas da DA<sup>35</sup>.



**Figura IV** - Possíveis conformações dos monômeros de Aβ e suas diferentes formas de agregação.

Verificou-se recentemente que a estrutura em grampo do Aβ pode rearranjar-se em diferentes conformações, o que explicaria a variedade de espécies oligoméricas observadas<sup>33</sup>.

As estruturas dos oligômeros e a formação das fibrilas são consideravelmente dependentes do ambiente celular. Por exemplo, protofibrilas são instáveis em solução, mas podem ser estabilizadas por superfícies. Superfícies hidrofóbicas promovem a agregação de estruturas amorfas, e superfícies carregadas promovem a formação fibrilar<sup>56</sup>. A agregação de monômeros de Aβ é passível de ocorrer por meio de diferentes caminhos. Inicialmente, pode haver a dimerização do peptídeo formando oligômeros fibrilares que, em seguida, polimerizam-se para formar fibrilas amiloides maduras<sup>35,36</sup>. O mesmo dímero pode formar oligômeros pré-fibrilares, gerando em seguida protofibrilas que podem sofrer uma mudança conformacional em bloco para formar fibrilas amiloides<sup>49,62</sup>. Biometais, como o cobre, podem mediar a dimerização dos monômeros de Aβ, formando pequenos oligômeros de Aβ-Cu e, eventualmente, levando à formação de agregados maiores<sup>35,36</sup>.

Os oligômeros e as protofibrilas aparentam ser os estados de aglomeração de maior toxicidade <sup>46,47</sup>. Estudos *in vitro* demonstraram que os oligômeros de A $\beta$  exercem uma forte ação inibitória sobre a potenciação de longa duração, um fenômeno de melhoria duradoura na transmissão do sinal entre dois neurônios, que contribui para a plasticidade sináptica <sup>66-68,70-80</sup>.

### 12.2.5.1.2.5. O Papel da Proteína Tau: Possivelmente uma Consequência

Análises imunocitoquímicas e bioquímicas dos emaranhados neurofibrilares intraneuronais levaram à conclusão de que outra proteína, denominada proteína “tau”, associada aos microtúbulos, é a principal ou, mais provavelmente, a única subunidade dos filamentos helicoidais emparelhados encontrados nesses emaranhados, assim como em muitas das neurites distróficas observadas no córtex de pacientes com DA <sup>83</sup>. Diversos estudos demonstraram que esta proteína, normalmente solúvel, encontra-se hiperfosforilada em quadros de DA. Isto acaba tornando-a um polímero insolúvel filamentosos, o que parece desregular a cascata citoplasmática de fosforilações e desfosforilações <sup>70,71</sup>. Diversos estudos indicam que o acúmulo de A $\beta$  pode ser o evento ativador da hiperfosforilação da proteína tau, porém os fatores que desencadeiam este desequilíbrio ainda não são bem entendidos <sup>3,71,87</sup>.

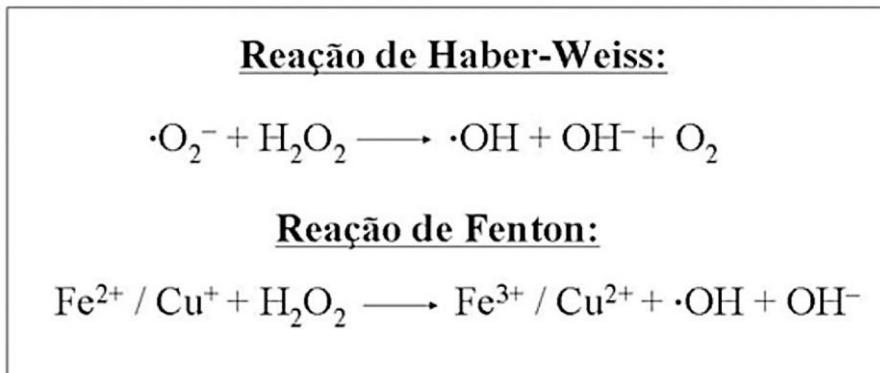
Emaranhados neurofibrilares que contêm proteínas tau hiperfosforiladas são encontrados também em outras doenças neurológicas, sugerindo fortemente que estas alterações do citoesqueleto possam ser uma resposta secundária, embora de vital importância, para diversas lesões cerebrais <sup>57,81</sup>.

### 12.2.6.1.2.6. A Hipótese Metálica

Nos últimos anos, com a ampla discussão a respeito da hipótese da cascata amiloide, um número crescente de evidências passou a sugerir que os íons metálicos endógenos, particularmente os que possuem atividade redox, tais como cobre (II) e ferro (III), além de certos íons não redox-ativos, como o zinco (II), podem contribuir para a evolução de doenças neurodegenerativas, favorecendo a agregação de A $\beta$  e aumentando a sua toxicidade <sup>5,16,20,35,36,43,79</sup>.

Por exemplo, tanto o cobre quanto o zinco aumentam a velocidade de agregação do peptídeo A $\beta$  sintético em meio aquoso <sup>55,12</sup>, provavelmente por ligação aos resíduos de histidina do mesmo <sup>43,84</sup>, e estão anormalmente distribuídos em pacientes com DA, <sup>73,74</sup> particularmente presentes no hipocampo e nas amígdalas, no interior do núcleo e nas áreas periféricas das placas senis <sup>17,20,51,68</sup>.

Estes biometais induzem o aumento do estresse oxidativo no cérebro, devido à sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), como radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, além de espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico, via reações de Haber-Weiss e de Fenton (Figura V). Os danos celulares causados pelas ERO e ERN são extensos. Por exemplo, a oxidação do ferro por meio da reação de Fenton gera anormalidades no RNA, que, na DA, é particularmente afetado, causando grande redução na síntese proteica <sup>88</sup>, enquanto o radical hidroxila provoca diversos danos às biomoléculas atacando as bases nitrogenadas e a desoxirribose do DNA, reagindo com as cadeias laterais de aminoácidos e proteínas (podendo gerar fragmentos proteicos não funcionais) e também com lipídeos de membrana, convertendo sítios lipídicos específicos em novos centros de formação de radicais livres <sup>6,7,8</sup>.



**Figura V** - Reações de Haber-Weiss e de Fenton

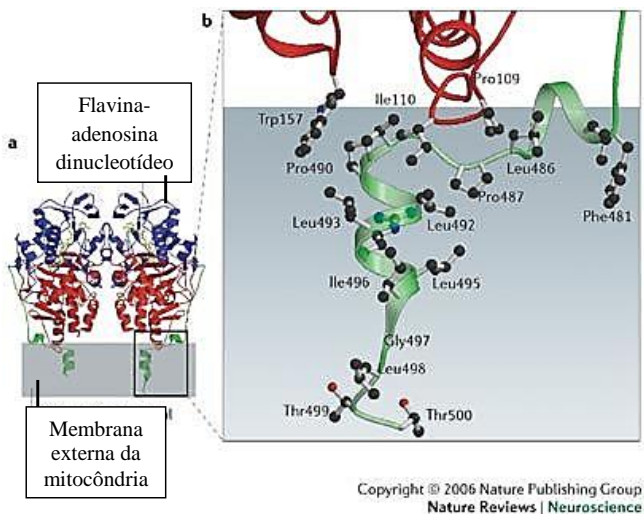
A hipótese mais explorada para a origem da DA é aquela relacionada à cascata amiloide. Mas, prevenir os efeitos neurotóxicos de espécies reativas de oxigênio (ROS) com sequestradores de radicais e / ou inibir sua formação com inibidores da monoamina oxidase (MAO), que bloqueiam a geração catalítica pela MAO do peróxido de hidrogênio, um precursor de ROS, é uma importante estratégia para lidar com a DA <sup>23</sup>.

### 13.2. MONOAMINA OXIDASE COMO ALVO TERAPÊUTICO

Monoamina oxidase [EC 1.4.3.4 (MAO)] são enzimas contendo flavina como uma proteína integral localizadas na membrana externa da mitocôndria. MAO são proteínas que catalisam a desaminação oxidativa de monoaminas endógenas ou exógenas (reação 1) <sup>26</sup>.



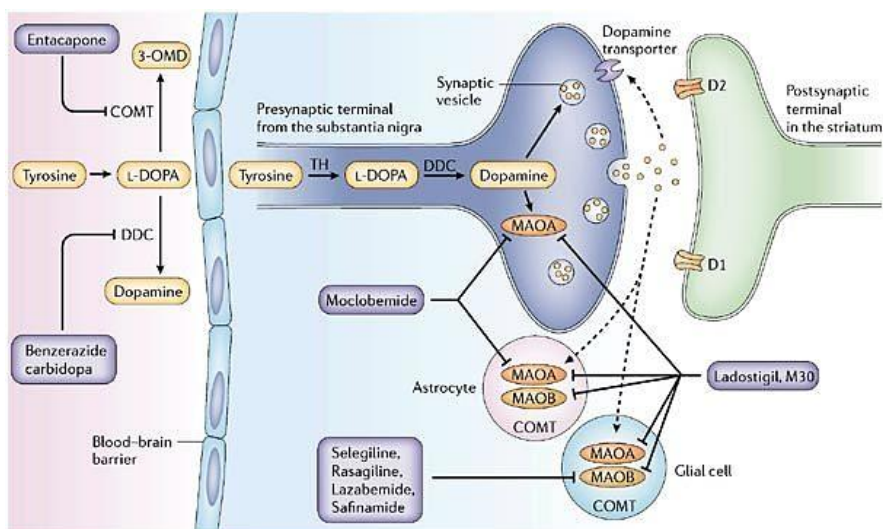
Ma-A MAO existe nas regiões neuronais e não neurais do cérebro, bem como nos órgãos periféricos. A principal função da MAO é regular os níveis de aminas biogênicas presentes nos tecidos, especialmente no cérebro (Figura VI).



**Figura VI** - Estrutura cristalina da MAO-B humana (Moussa B. H. Youdim, Dale Edmondson & Keith F. Tipton. 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience* volume 7, pages 295–309).

Existem duas formas de MAO: MAO-A e MAO-B. Essas isoformas foram definidas principalmente por afinidades de substrato e sensibilidades de inibidores. Entre os principais substratos fisiológicos da MAO encontram-se neurotransmissores (dopamina, serotonina, norepinefrina, tiramina e triptamina) e aminas exógenas, como a neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) <sup>63</sup>.

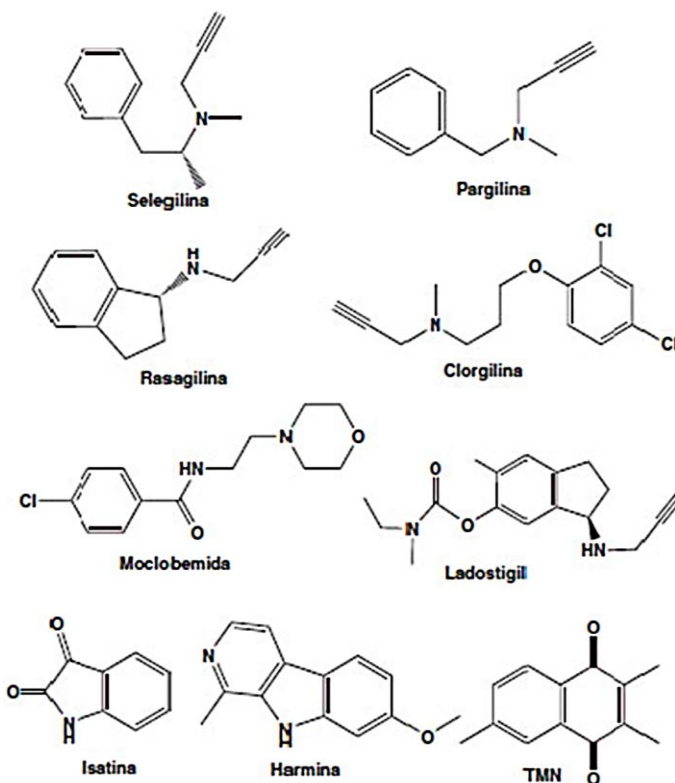
Assim, MAO-A degrada, de preferência, 5-hidroxitriptamina (serotonina), melatonina, noradrenalina e adrenalina. A MAO-B de preferência degrada a feniletilamina, um alcalóide resultante do metabolismo da fenilalanina. A ingestão de feniletilamina promove a liberação de dopamina que atua no cérebro, promovendo a euforia (Figura VII). Quanto aos inibidores, a MAO-A é preferencialmente inibida por clorgilina e, MAO-B por deprenil e ambas são inibidas por pargilina <sup>63</sup>.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Neuroscience

**Figura VII** - Síntese da dopamina e metabolismo pela MAO-A e MAO-B (Moussa et al. 2006.)

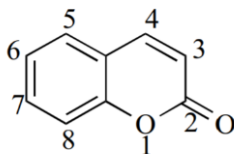
Uma atividade anormal da isoforma MAO-B está relacionada a várias desordens neurológicas, como DP e DA, enquanto que a isoforma MAO-A parece estar associada com condições psiquiátricas como depressão e ansiedade<sup>85</sup>. Assim, diversos IMAO têm sido desenvolvidos visando tanto o tratamento de distúrbios de depressão (inibição da MAO-A), como as terapias sintomáticas da DP e da DA<sup>85,86</sup> (Figura VIII). Uma redução dos níveis de atividade de MAO resultaria então num aumento nas concentrações de certos neurotransmissores no cérebro, cujo declínio está intimamente ligado ao processo de envelhecimento, além de uma diminuição na produção de peróxido de hidrogênio, subproduto da reação catalisada por MAO<sup>26</sup>.



**Figura VIII** - Estrutura de alguns inibidores da MAO. Selegilina, pargilina, rasagilina, ladostigil e isatina (inibidores da MAO-B); clorgilina, moclobemida e harmina (inibidores da MAO-A); TMN (inibidor não seletivo).

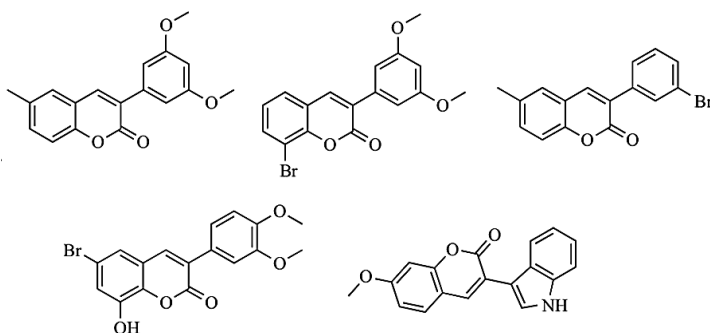
Está bem estabelecido que a atividade de MAO-B pode aumentar até três vezes no córtex temporal, parietal e frontal dos pacientes com DA, em comparação com pacientes saudáveis. Esse aumento na atividade da MAO-B produz altos níveis de  $H_2O_2$  e radicais livres oxidantes, que estão relacionados ao desenvolvimento do estresse oxidante<sup>43</sup>.

Estudos preliminares mostraram o domínio dos compostos de cumarina no tratamento de DA e DP para melhorar a qualidade de vida dos idosos. As cumarinas representam um grupo importante de heterocíclicos naturais e / ou sintéticos que contêm oxigênio, possuindo uma estrutura benzopirônica típica (Figura IX). A simplicidade e a versatilidade da estrutura de cumarina tornam-na um ponto de partida interessante para uma ampla gama de aplicações biológicas<sup>52</sup>.



**Figura IX** – Estrutura da cumarina (2H-chromen-2-one). (Ilkay Erdogan Orhan, Ozan Gulcan. 2015. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 1673-1682).

Inibidores da MAO são usados para o tratamento de vários distúrbios psiquiátricos e neurológicos. De fato, os inibidores da MAO-A são particularmente úteis para o tratamento da depressão e da ansiedade, enquanto os inibidores da MAO-B são particularmente empregados no tratamento da DP e da DA. Mesmo que vários compostos naturais que contêm a cumarina tenham sido isolados e descobertos como potenciais inibidores da MAO, a geração da relação estrutura-atividade atual em cumarinas pelo seu potencial para inibir as enzimas MAO é atribuída principalmente às abordagens sintéticas após os estudos de projeto que mostram as modificações e substituições no sistema 2H-cromen-2-ona. A molécula de cumarina foi extensamente modificada através de várias substituições nas posições C3,4,6,7 e 8 para obter inibidores potentes da MAO-A e MAO-B <sup>84</sup> (Figura X).



**Figura X** - Alguns derivados de cumarina com atividade inibitória contra MAO-B (Ilkay Erdogan Orhan, Ozan Gulcan. 2015. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 1673-1682).



### **3. Justificativa**

Com o aumento da expectativa de vida dos seres humanos, ocorre uma elevação no número de casos de pacientes com neuropatias degenerativas, como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson. Estas patologias ainda não possuem formas de diagnóstico e tratamento satisfatórias. Assim, esta pesquisa pode colaborar para um avanço na busca de tratamentos mais eficazes e seguros, e avanços no uso de biomarcadores para diagnóstico mais preciso destas doenças.

A monoamina oxidase (MAO) foi escolhida como alvo deste estudo visto que existem numerosas publicações descrevendo essa enzima como um alvo promissor para o tratamento da doença de Alzheimer. Além disso, por estar presente também no sangue, existe a possibilidade da MAO poder servir para o diagnóstico prévio de neurodegeneração.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

- Estudar o efeito inibitório de derivados cumarínicos sobre a monoamina oxidase em fração mitocondrial de cérebros de ratos Wistar.

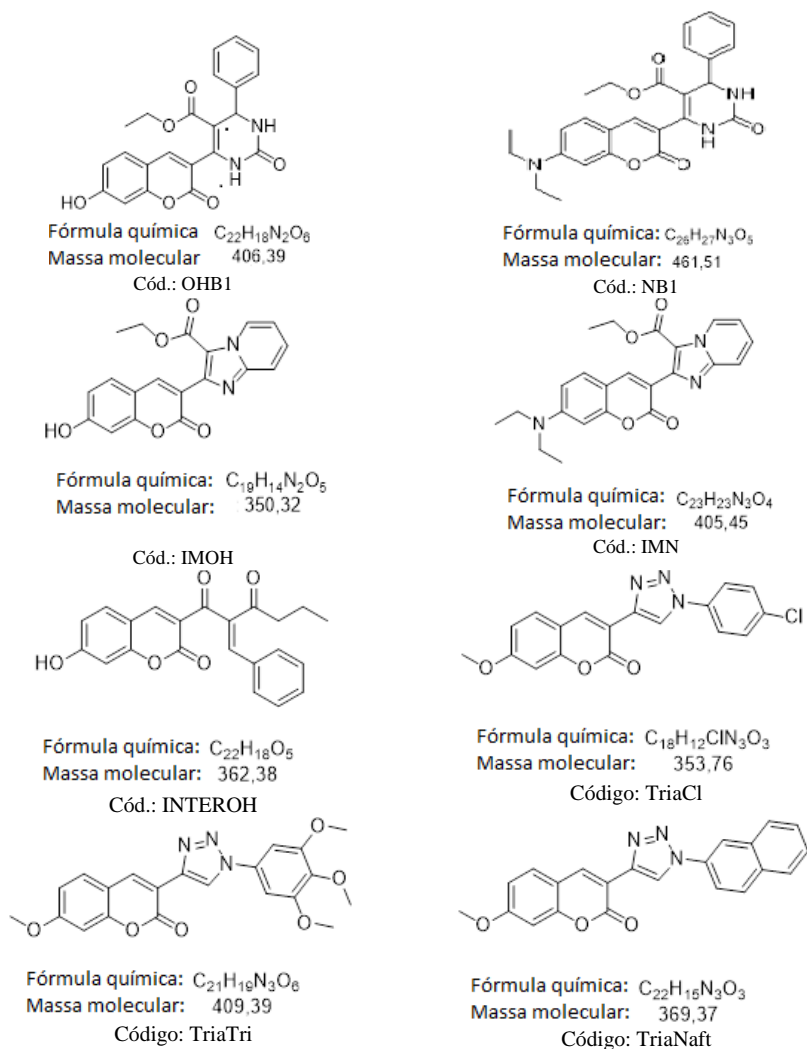
### 4.2. Objetivos Específicos

- Verificar quais derivados cumarínicos apresentam maior ~~poder~~ efeito de inibição da MAO.
- Calcular a concentração necessária para inibir 50% da atividade de MAO (IC<sub>50</sub>) em fração mitocondrial de cérebros de ratos Wistar.

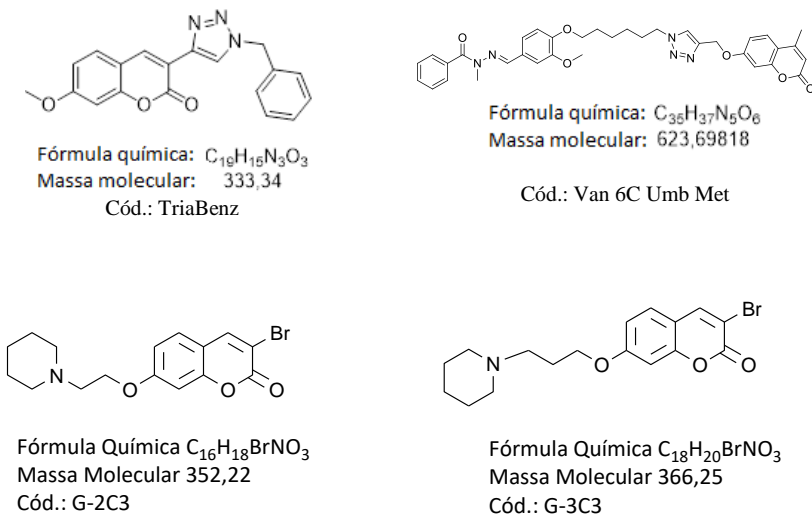
## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Obtenção dos Compostos Sintéticos

Os compostos sintéticos foram obtidos em colaboração com o professor Arthur Eugen Kummerle, professor do programa de Pós-Graduação em Química (IQ/UFRRJ). Na [Figura 10-XI](#) seguem as estruturas dos compostos usados nesse estudo.



**Figura XI** - Compostos sintéticos para estudos de inibição da MAO.



**Figura XI** – Continuação.

## 5.2. Animais Utilizados no Estudo

Ratos Wistar foram obtidos no Departamento de Farmacologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (CEUA IBRAG PROTOCOLOS 010/2018 e 011/2018), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os ratos foram mantidos em biotério adequado até o dia de serem eutanasiados. A eutanásia ocorreu com os animais anestesiados, tendo a coluna cervical sido deslocada. Os cérebros foram removidos e lavados em solução de salina fisiológica, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em biofreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 5.3. Preparo da Fração Mitocondrial Cerebral

Os cérebros foram descongelados sobre gelo, pesados e homogeneizados a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  em quatro volumes de solução tampão fosfato de sódio  $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $0,25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarose (solução tampão de homogeneização). Foram realizadas centrifugações diferenciadas com o homogeneizado. A primeira centrifugação ocorreu a  $700 \times g$  por 10 minutos, o depósito foi descartado e uma segunda centrifugação a  $20.000 \times g$  por 20 minutos. Todas as etapas foram realizadas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado com 1 mL de solução tampão de homogeneização para cada grama de tecido homogeneizado (fração mitocondrial). O volume total da fração mitocondrial foi alíquotado e armazenado em criotubos e estocado em biofreezer Thermo Scientific a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.4. Determinação de Proteínas

Para a determinação da concentração de proteínas da fração mitocondrial, foi utilizado o método de Peterson <sup>65</sup>. A albumina bovina sérica foi usada como padrão de proteínas.

#### 5.5. Padronização do Ensaio da Atividade da MAO

A atividade de MAO foi determinada por ensaio de fluorescência usando a quinuramina como substrato <sup>48</sup>. O produto da reação, a 4-hidroxiquinolina é determinada em um comprimento de onda de excitação de 315 nm e 398 nm de emissão.

O meio reacional continha quinuramina 50 µM, fração das mitocôndrias com 50 µg de proteínas em solução tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,6 (quantidade suficiente para 2 mL de volume final).

Para determinação da atividade da MAO contendo inibidor, foi adicionado DMSO em quantidades iguais para todos os ensaios e brancos. A quantidade de proteínas presente na fração mitocondrial foi padronizada para que a enzima trabalhasse na sua velocidade máxima saturada pelo substrato. A concentração de substrato foi de 50µM. A reação ocorreu a 37 °C.

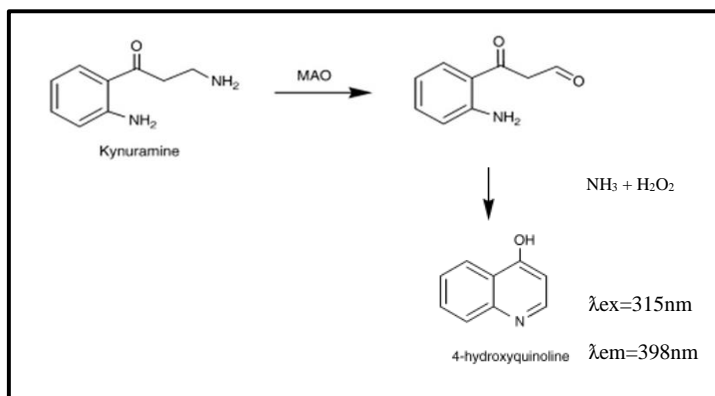
Para se calcular a atividade da MAO foi preciso quantificar primeiro a 4-hidroxiquinolina (4-HQ). Para isso, foi feita uma curva padrão com quantidades conhecidas de 4-HQ que variaram entre 0,05 e 3 nmol. Foi obtida uma curva linear com  $R^2 = 0,9998$ , ou seja, o aumento da intensidade de fluorescência ocorre proporcionalmente com a quantidade de 4-HQ. A essa curva correspondeu uma equação (de uma reta) para ser usada no cálculo da concentração de produto formado durante os ensaios de MAO.

$$[4\text{-HQ}] \text{ (nmols)} = (\text{IF} - 8,8529)/423,51$$

Em que IF é a intensidade de fluorescência do 4-HQ.

A fim de ensaiar as atividades de MAO com máxima eficiência catalítica (velocidades iniciais máximas), buscamos conhecer suas condições ótimas para o ensaio da reação de desaminação da quinuramina. Para isso, fizemos ensaios enzimáticos variando as concentrações de proteínas (5 a 100 µg de proteína para cada mL de meio reacional). A fração mitocondrial foi incubado com a quinuramina por 10 minutos em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6. Passados os 10 min a reação foi interrompida colocando os tubos de ensaio em água fervente durante 3 min. Os tubos sem a amostra de cérebro (branco) foram submetidos ao mesmo tratamento, mas a solução de quinuramina foi pipetada dentro deles apenas após a transferência para o banho de água fervente a fim de se medir desaminação não enzimática do substrato. Após o banho fervente, os tubos de ensaio foram centrifugados em centrífuga clínica a 3500 rpm durante 15 min e a uma alíquota de 500 µL do sobrenadante adicionou-se 1 mL de uma solução 1 M de NaOH para revelar a fluorescência do produto da reação, a 4-hidroxiquinolina (4-HQ), que foi registrada num comprimento de onda de excitação de 315 nm e de emissão de 398 nm no espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-3010.

A reação catalisada pela MAO é mostrada a seguir (Figura XII):



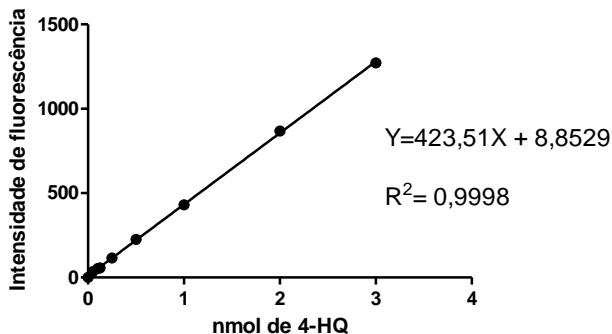
**Figura XII** - Ensaio da atividade da monoamina oxidase usando quinuramina como substrato.

### 5.6. Gráficos e Análise Estatística

A comparação das médias dos grupos foi feita usando o teste One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltiplas de Tuckey- Kramer com o software GraphPad InStat versão 3.10 para Windows. Os gráficos foram feitos no software GraphPad Prism versão 5.01 para Windows. Os dois programas pertencem à GraphPad Software-, San Diego California USA.

## 6. RESULTADOS

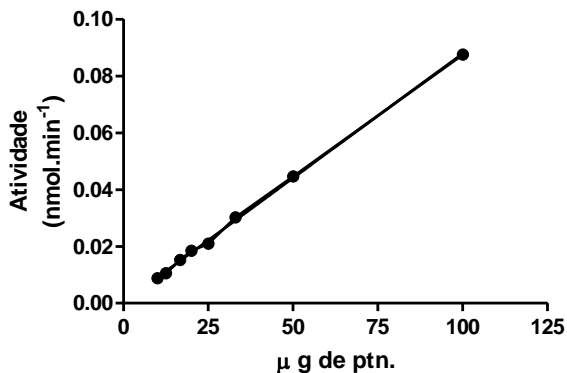
A Figura XIII ilustra a curva padrão de 4-HQ, produto da reação catalisada pela MAO quando o substrato é a quinuramina. Esse gráfico foi usado para os cálculos da quantidade do produto formado, a 4-hidroxiquinolina, na reação catalisada pela MAO.



**Figura XIII** - Curva padrão de 4-hidroxiquinolina (4-HQ).

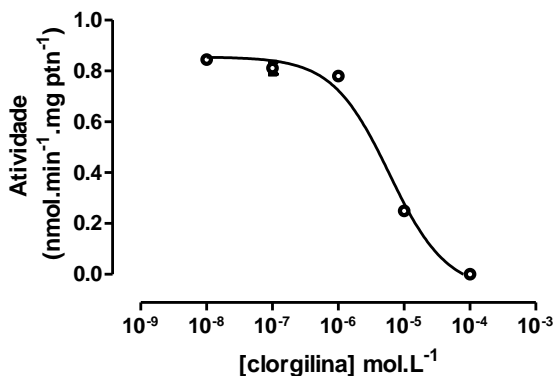
Pode-se observar pela [Figura 12XIII](#), que o método de ensaio da MAO através da quantificação fluorimétrica do seu produto, a 4-hidroxiquinolina é linear até 3 nmol de produto. Além disso, pode-se observar que as concentrações de 0,05 a 3 nmol são mensuradas através desse método.

Na Figura XIV observa-se o efeito da concentração de proteínas mitocondriais sobre a atividade de MAO. Pode-se observar que a atividade de MAO apresentou crescimento linear no meio reacional até a concentração de 100  $\mu\text{g}$  de proteínas no tubo. A linearidade foi de 0,9998.



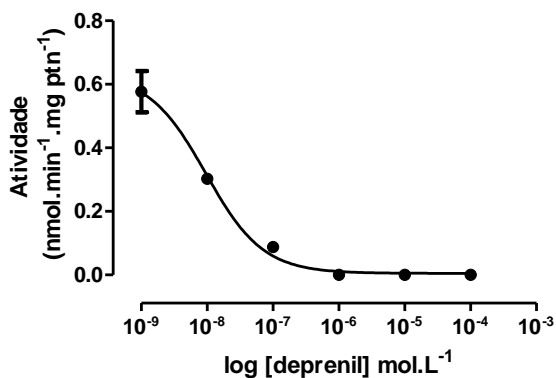
**Figura XIV** – Atividade da MAO com diferentes quantidades de proteína.

O efeito da concentração dos dois inibidores específicos de MAO, clorgilina (MAO-A) (Figura XV) e deprenil (MAO-B) (Figura XVI) sobre a atividade da MAO cerebral de rato Wistar foi ensaiado para comparação com demais compostos candidatos a possíveis inibidores. Pôde-se calcular o  $IC_{50}$  para clorgilina sobre MAO cerebral de rato em  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .



**Figura XV** – Atividade da MAO com a presença do inibidor clorgilina nas concentrações de  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>.

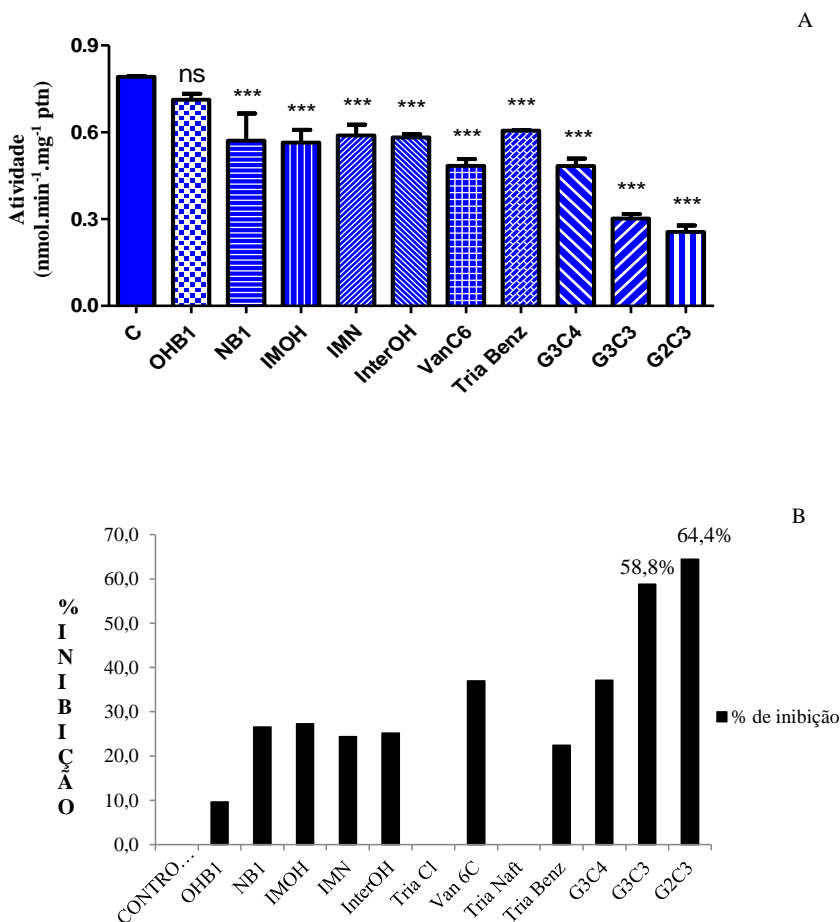
Já para o deprenil (Figura XVI), pôde-se observar que a enzima cerebral de rato é muito mais sensível ( $IC_{50} = 0,0095 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) quando comparada à inibição por clorgilina, chegando a uma diferença de  $IC_{50}$  de cerca de 600 vezes. Este resultado pode indicar a maior presença de MAO-A no cérebro de rato Wistar.



**Figura XVI** - Atividade da MAO com a presença do inibidor deprenil nas concentrações de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>.



Foi realizado uma triagem (“screening”) com os possíveis inibidores da MAO, todos na concentração final de  $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, para avaliarmos aqueles que apresentassem o maior percentual de inibição sobre a atividade da enzima cerebral de rato. A Figura XVII - A mostra o resultado dessa triagem. De uma série de dez compostos sintetizados derivados de cumarina, dois deles apresentaram um percentual inibidor da MAO acima de 60% da atividade controle (Figura XVII - B). Estes dois compostos, G-2C3 e G-3C3, foram estudados para determinarmos os valores de IC<sub>50</sub> frente a MAO da fração mitocondrial do cérebro de rato Wistar.



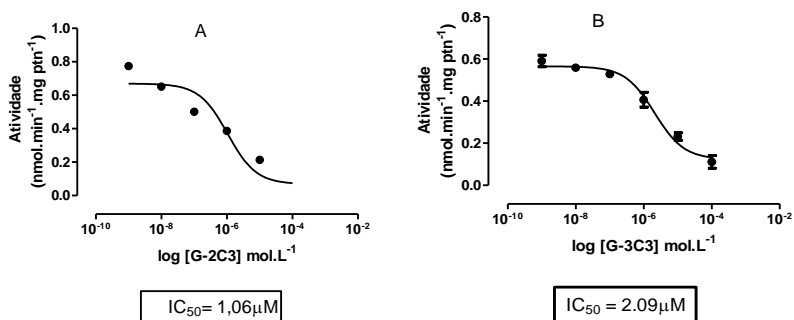
**Figura XVII** – “Screening” de possíveis inibidores da MAO. (A) Atividade da MAO. Todos os inibidores foram utilizados na concentração de  $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. (B) A média de inibição entre os inibidores (exceto G3C3 e G2C3) foi de 26,2%.

Pode-se observar que todas as moléculas testadas causaram efeitos estatisticamente diferentes do controle. A ~~tabela~~ Tabela I mostra as percentagens de inibição de cada composto testado nesse trabalho.

**Tabela I - % de inibição**

<b>Molécula</b>	<b>Atividade de MAO (nmol . min<sup>-1</sup>. mg ptn<sup>-1</sup>)</b>	<b>% inibição</b>
<b>Controle</b>	0,793 ± 0,0023	-
<b>OHB1</b>	0,712 ± 0,029	10,14
<b>NB1</b>	0,571 ± 0,133	27,96
<b>IMOH</b>	0,565 ± 0,0534	28,73
<b>IMN</b>	0,589 ± 0,053	25,69
<b>InterOH</b>	0,583 ± 0,016	26,50
<b>Van 6C</b>	0,484 ± 0,032	28,44
<b>Tria Benz</b>	0,606 ± 0,0023	23,59
<b>G3C4</b>	0,483 ± 0,036	39,06
<b>G3C3</b>	0,302 ± 0,023	61,88
<b>G2C3</b>	0,255 ± 0,033	67,83

Para a determinação da IC<sub>50</sub>, foram realizadas curvas com concentrações de inibidores que variaram de 10<sup>-9</sup> mol.L<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>. Pôde-se observar que para os dois compostos testados não houve uma diferença muito pronunciada em relação aos valores de IC<sub>50</sub>. Para o composto G-2C3, o valor de IC<sub>50</sub> foi de 1,058 µmol.L<sup>-1</sup> enquanto que para o composto G-3C3 foi de 2,089 µmol.L<sup>-1</sup> (Figura XVIII).



**Figura XVIII** – Determinação do  $IC_{50}$  para os compostos G-2C3 (A) e G-3C3 (B).

Foi feita a comparação entre os valores de  $IC_{50}$  dos derivados cumarínicos e os inibidores clássicos da MAO e pôde-se observar que eles foram cerca de 3 vezes (G-2C3) e 6 vezes (G-3C3) mais eficientes quando comparados com a clorgilina, mas muito menos eficientes que o deprenil ([Tabela II](#)).

**Tabela II** –  $IC_{50}$  de inibidores de MAO cerebral de rato

Composto	$IC_{50}$ $\mu$ mol.L <sup>-1</sup>
Clorgilina	5,97
Deprenil	0,0095
G-2C3	2,09
G-3C3	1,06

## 7. DISCUSSÃO

A cumarina é uma substância fenólica amarela encontrada em rizomas de *Cúrcuma longa* L. (Zingiberaceae), que mostrou diminuição da atividade da MAO-A em experimentos *in vivo*, de maneira dose-dependente, enquanto que não afetou a atividade enzimática da MAO-B<sup>63</sup>.

Uma série de estudos tem definido o potente efeito inibitório da MAO causado por derivados cumarínicos, conforme destacado em algumas revisões recentes. Por exemplo; os compostos furocumarínicos, psoraleno e isopsoraleno, isolados de *Psoralea corylifolia* L. (Fabaceae), foram descritos por mostrarem uma inibição reversível e dose-dependente das enzimas MAO-A e MAO-B. O isopsoraleno ( $IC_{50} = 12,8 \pm 0,5 \mu M$ ) foi mais eficaz contra MAO-A do que o psoraleno ( $IC_{50} = 15,2 \pm 0,5 \mu M$ ). Uma inibição mais fraca contra MAO-B foi causada por estes dois compostos<sup>63</sup>.

Outro composto derivado de cumarina, a lacinartina, encontrado no tronco de *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc. (Rutaceae) inibiu tanto a MAO-A ( $IC_{50} = 5,7 \mu M$ ) quanto a MAO-B ( $IC_{50} = 28,6 \mu M$ ) de maneira não competitiva. A lacinartina foi mais eficaz contra a MAO-A. Um derivado da diidro-cumarina [2-metoxi-3-(1,1'-dimetilalil)-6a, 10adi-hidro-benzo (1,2 c-croman-6-ona) isolado de *Gentiana lutea* mostrou uma atividade inibitória forte sobre a MAO-B ( $IC_{50} = 2,9 \mu M$ ) e fraca da MAO-A ( $IC_{50} = 100 \mu M$ )<sup>63</sup>.

É importante ressaltar que todos estes derivados de cumarina nos estudos mencionados acima apresentaram uma capacidade inibitória das MAO menores que o G-2C3 e o G-3C3 sintetizados no LaD-Mol-QM, demonstrando a relevância de nosso trabalho para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e a importância de prosseguir com as pesquisas desses dois compostos para que possam futuramente ser úteis no tratamento das doenças neurodegenerativas e da depressão.

Várias pesquisas já exploraram uma série de compostos derivados de cumarina como inibidores da MAO. Secci e colaboradores, por exemplo, usaram um grande número de derivados de cumarina sintéticos tendo uma metilcetona, etil éster, ácido carboxílico, ou grupo carbohidrazido na posição 3 e uma variedade de substituintes nas posições 5, 6, 7 e 8 dos núcleos de cumarina<sup>69</sup>.

Os compostos que apresentaram uma inibição significativa, sintetizados pelo professor Arthur Kummerle, apresentam substituição na posição 7 por grupamento alcoxi-amino, e halogênio (bromo) na posição 3.

Os estudos com os produtos sintetizados pelo professor Arthur Kummerle deverão ser continuados com a realização de experimentos usando a MAO purificado de seres humanos (hMAO).

O propósito desse trabalho foi investigar novas substâncias com estruturas derivadas de cumarinas capazes de auxiliar no tratamento de doenças neurológicas como a doença de Alzheimer.

## 8. CONCLUSÃO



Os compostos G-2C3 e G-3C3 mostraram que podem inibir a MAO de fração mitocondrial de cérebro de rato Wistar em concentração três vezes menor, quando o composto é o G-2C3 e, seis vezes menor quando o composto é o G-3C3 em relação à clorgilina um inibidor específico da MAO-A.



Em relação ao composto referência deprenil, inibidor específico da MAO-B, os compostos estudados foram muito pouco eficientes.



Os estudos deverão ser continuados com a realização de experimentos usando-se a hMAO A e a hMAO B purificadas, para averiguar se G-2C3 e G-3C3 apresentam atividade inibitória sobre MAO humana. O valor da concentração de inibidor G-2C3 para inibir 50% da atividade de MAO ( $IC_{50}$ ) foi de  $2,09 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e, para o inibidor G3-C3 foi de  $1,06 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. (JPND), E.J.-N.([s.d.]). de JPND Research. Disponível em: <<http://www.neurodegenerationresearch.eu/about/what/>>. Acesso em maio de 2013.
2. Alzheimer's association. , de Alzheimer's Australia. Disponível em: <<http://www.fightdementia.org.au/understanding-dementia/section-1-about-dementia.aspx>>. Acesso em maio de 2013.
3. ANNAMALAI, B.; WON, J.S.; CHOI, S.; SINGH, I.; SINGH, A.K.. Role of s-nitrosoglutathione mediated mechanisms in tau hyper-phosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 458, nº1, 214-219, 2015.
4. Associação Brasileira de Alzheimer (Abraz). Disponível em: <<http://www.portalnovidade.com.br/materia/7315/doenca-neurodegenerativa-acomete-milhoes-em-todo-o-mundo.html>>.\_Acesso em 15 de abril de 2015.
5. AZIMI, S.; RAUK, A.. On the involvement of copper binding to the N-terminus of the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease: a computational study on model systems. **International Journal of Alzheimer's Disease**, 2011, Article ID 539762, 1-15, 2011.
6. BARNHAM, K.J.; MASTERS, C.L.; BUSH, A.I.. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews Drugs Discovery**, 3, 205-214, 2004.
7. BARNHAN, K.J.; BUSH, A.L.. Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Current Opinion in Chemical Biology**, 12, nº 2, 222-228, 2008.
8. BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies relativas e defesa do organismo. **Química nova**, 29, nº 1, 113-123, 2006.
9. BARTUS, R.T.; DEAN, R.L.; BEER, B.; LIPPA, A.S.. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunctions. **Science**, 217, 408-417, 1982.
10. BENNET, B.M.; REYNOLDS, J.N.; PRUSKY, G.T.; DOUGLAS, R.M.; SUTHERLAND, R.J.; THATCHER, G.R.. Cognitive deficits in rat after forebrain cholinergic depletion are reversed by a novel no mimetic nitrate ester. **Neuropsychopharmacology**, 32, nº 3, 505-513, 2006.
11. BERGER-SWEENEY, J.; ARNOLD, A.; GABEAU, D.; MILLS, J.. Sex differences in learning and memory in mice: effects of sequence of testing and cholinergic blockade. **Behavioral Neuroscience**, 109, nº 5, 859-873, 1995.
12. BUSH, A.L.; PETTINGELL, W.H.; MULTHAUP, G.; d PARADIS, M.; VONSATTEL, J.P.; GUSELLA, J.F.; BEYREUTHER, K.; MASTERS, C.L.; TANZI, R.E.. Rapide induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. **Science**, 265, nº 5177, 1464-1467, 1994.

13. CHARTIER-HARLIN, M.C.; CROWFORD, F.; HOULDEN, H.; WARREN, A.; HUGHES, D.; FIDANI, L.; GOATE, A.; ROSSOR, M.; ROQUES, P.; HARDY, J.. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of Beta-amyloid precursor protein gene. **Nature**, 353, 844-846, 1991.
14. CITRON, M.; OUTERSDORF, T.; HAASS, C.; McCONLOQUE, L.; HUNG, A.Y.; SEUBERT, P.; VIGO-PELFREY, C.; LIEBERBURG, I.; SELDKOE, D.J.. Mutation of beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. **Nature**, 360, nº 6405, 672-674, 1992.
15. COYLE, J.T.; PRICE, D.L.; DeLONG, M.R.. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science**, 219, 1184-1190, 1983.
16. CRADDOCK, T.J.; TUSZYNSKI, J.A.; CHOPRA, D.; CASEY, N.; GOLDSTEIN, L.E.; HAMEROFF, S.R.; TANZI, R.E.. The zinc dyshomeostasis hypothesis of Alzheimer's disease. **Plos One**, 7, nº 3, 1-16, 2012.
17. DANSHER, G.; JENSEN, K.B.; FREDERICKSON, C.J.; KEMP, K.; ANDREASEN, A.; JUHL, S.; STOLLENBERG, M.; RAVID, R.. Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's disease brains: a proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material. **Journal Neuroscience Methods**, 76, nº 1, 53-59, 1997.
18. DAVIES, P.; MALONEY, A.J.F.. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. **The Lancet**, 308, 1403, 1976.
19. DE FALCO, A.; CUKIERMAN, D.S.; HAUSER-DAVIS, R.A.; REY, N.A.. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, 39, nº 1, 1678-17064, 2016.
20. DEIBEL, M.A.; EHMANN, W.D.; MARKESBERY, W.R.. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. **Journal of the Neurological Sciences**, 143, nº 1-2, 137-142, 1996.
21. DEUTSH, J.A.. The cholinergic synapse and the site of memory. **Science**, 174, 788-794, 1971.
22. DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S.F.. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacology Reviews**, 51, nº 1, 7-61, 1999.
23. DOMINGUEZ, J.L.; FERNÁNDEZ, NIETO, F.; BREA, J.M.; CATTO, M.; SOTO-OTERO, R.. 8-Aminomethyl-7-hydroxy-4-methylcoumarins as multitarget leads for Alzheimer's Disease. **Chemistry Select**, 1, 2742-2749, 2016.
24. DRACHMAN, D.A.; SAHAKIAN, B.J.. Memory and cognitive function in the elderly: A preliminary trial of physostigmine. **Archives of Neurology**, 37, (10), 674-675, 1980.

25. FINCKH, U.; KUSCHEL, C.; ANAGNOSOULI, M.; PATSOURIS, E.; PANTS, G.V.; GATZONIS, S.; KAPAKI, E.; DAVAKI, P.; LAMSZUS, K.; STAVROU, D.; GAL, A.. Novel mutations and repeated findings of mutations in familial Alzheimer's disease. **Neurogenetics**, 6, nº 2, 85-89, 2005.
26. FOLLMER, C.; BEZERRA-NETO, H.J.C.. Fármacos multifuncionais: monoamina oxidase e a-sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. **Química Nova**, 36, nº 2, 1-12, 2013.
27. GANDY, S.. The role of cerebral amyloid beta accumulation in forms of Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 115, (5), 1121-1129, 2005.
28. GIACCONE, G.; TAGLIAVINI, F.; LINOLI, G.; BOURAS, C.; FRIGERIO, L.; FRANGIONE, B.; BUGIANE, O.. Down patients: Extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neuroscience Letters*, 97, (1-2), 232-238, 1989.
29. GOATE, A.; CHARTIER-HARLIN, M.C.; MULLAN, M.; BROWN, J.; CRAWFORD, F.; FIDANE, L.; GIUFFRA, L.; HAYNES, A.; IRVING, N.; JAMES, L.. **Nature**, 349, 704-706, 1991.
30. GREEN, A.; ELLIS, K.A.; ELLIS, J.; BARTHOLOMEUSZ, C.F.; LLIC, S.; CROFT, R.J.; PHAN, K.L.; NATHAN, P.J.. Muscarinic and nicotinic receptor modulation of object and spatial n-back working memory in humans. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 81, nº 3, 575-584, 2005.
31. GREENAMYRE, J.T.; YOUNG, A.B.. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, 10, nº 5, 593-602, 1989.
32. GREENAMYRE, J.T.; MARAGOS, W.F.; ALBIN, R.L.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B.. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. **Prog. Neuropsychopharmacology Biology Psychiatry**, 12, nº 4, 421-430, 1988.
33. GU, L.; LIU, C.; GUO, Z.. Structural insights into Aβ<sub>42</sub> oligomers using site-directed spin labelling. **Journal Biological Chemistry**, 288, nº 26, 18673-18683, 2013.
34. HAASS, C.; HUNG, A.Y.; SELKOE, D.J.; TEPLow, D.B.. Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. **Journal Biological Chemistry**, 269, 17741-17748, 1994.
35. HANE, F.; LEONENKO, Z.. Effect of metal on kinetic pathways of amyloid-beta aggregation. **Biomolecules**, 4, nº 1, 101-116, 2014.
36. HANE, F.; TRAN, G.; ATTWOOD, S.J.; LEONENKO, Z.. Cu(+2) affects amyloid β<sub>42</sub> aggregation by increasing peptide-peptide binding forces. **Plos One**, 8, nº 3, 1-8, 2013.
37. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, McGraw-Hill: New York, 1996.



38. HARDY, J.A.; HIGGINS, G.A.. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, 256, n° 5054, 184-185, 1992.
39. HASS, C.; SCHLOSSMACHER, M.G.; HUNG, A.Y.; VIGO-PELFREY, C.; MELLON, A.; OSTSZIEWSKI, B.L.; LIEBERBURG, I.; KOO, E.H.; SCHENK, D.; TEPLow, D.B.. **Nature**, 359, 322-325, 1992.
40. HASSELMO, M.E.. The role of acetylcholine in learning and memory. **Current Opinion in Neurobiology**, 16, n° 6, 710-715, 2006.
41. HE, W.; BARROW, C.J.; The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. **Biochemistry**, 38, n° 33, 10871- 1877, 1999.
42. HENDRIKS, L.; van DUIJN, C.M.; CRAS, P.; CRUTS, M.; Van Hul, W.; van HARSKAMP, F.; WARREN, A.; McINNIS, M.G.; ANTONARAKIS, S.E.; MARTIN, J.J.. **Nature Genetics**, 1, 218-221, 1992.
43. HUANG, M.;XIE, S.S.; JIANG, N.; LAN, J.S.; KONG, L.Y.; WNAG, X.B.. Multifunctional coumarin derivatives: monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition, anti- $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) aggregation and metal chelation properties against Alzheimer's. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 25, 508-513, 2015.
44. IWATSUBO, T.; MANN, D.M.; ODAKA, A.; SUZUKI, N.; IHARA, Y.. Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes a beta 40 in Down syndrome. **Annals of Neurology**, 37, n° 3, 294-299, 1995.
45. KÁSA, P.;RANKONCZAY, Z.; GULYA,K.. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, 52, n° 6, 511-535, 1997.
46. KAYED, R.; SOKOLOV, Y.; EDMONDNS, B.; McINTIRE, T.M.; MILTON, S.C.; HALL, J.E.; GLABE, C.G.. permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of volume amyloid oligomers in protein misfolding diseases. **Journal Biological Chemistry**, 279, 46363-46366, 2004.
47. KLEIN, W,L.; KRAFFT, G.A.; FINCH, C.E.. Targeting small A-beta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? **Trends in Neurosciences**, 24, n°4, 219-224, 2001.
48. KRAJL, M.. A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. **Biochemical Pharmacology**, 14, 1683-1685, 1965.
49. LEE, J.; CULYBA, E.K.; POWERS, E.T.; KELLY, J.W.. amyloid-beta forms fibrils by nucleated conformational conversation of oligomers. **Nature Chemical Biology**, 7, 602-609, 2011.
50. LEVY, E.; CARMAN, M.D.; FERNANDEZ-MADRID, I.J.; POWER, M.D.; LIEBERBURG, I.; van DUINEN, S.G.; BOTS, G.T.; LUYENDIJK, W.; FRANGIONE, B.. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. **Science**, 248, n° 4959, 1125-1126, 1990.

51. LOVELL, M.A.; ROBERTSON, J.D.; TEESDALE, W.J.; CAMPBELL, J.L.; MARKESBERY, W.R.. Copper, iron, and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. **Journal of the Neurological Sciences**, 158, nº 1, 47-52, 1998.
52. MATOS, M.J.. Potent and selective MAO-B inhibitory activity: Amino-versus nitro-3-arylcoumarin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 25, 642-648, 2015.
53. MATTSON, M.P.. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. **American Physiological Society Reviews**, 77, nº 4, 1081- 1090, 1997.
54. MAYA, A. ([s.d.]). Masters Neurosciences – **Université de Strasbourg**: Disponível em <[http://neuromaster.ustrasburg.fr/forms%20and%20PDF/Biography\\_of\\_Alois\\_Alzheimer%20by%20.pdf](http://neuromaster.ustrasburg.fr/forms%20and%20PDF/Biography_of_Alois_Alzheimer%20by%20.pdf)>. Acesso em maio de 2013.
55. MIURA, T.; SUZUKI, K.; KOHATA, N.; TAKEUCHI, H.. Metal binding modes of Alzheimer's amyloid beta-peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. **Biochemistry**, 39, nº 23, 7024-7031, 2000.
56. MOORES, B.; DROLLE, E.; ATTWOOD, S.J.; SIMONS, J.; LEOLENKO, Z.. Effect of surfaces on amyloid fibril formation. **Plos One**, 6, nº 10, 1-10, 2011.
57. MUDHER, A.; LOVESTONE, S.. Alzheimer's disease-do tauists and Baptists finally shake hands? **Trends Neuroscience**, 25, nº1, 22-26, 2002.
58. MURRELL, J.; FARLOW, M.; GHETTI, B.; BENSON, M.D.. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. **Science**, 254, nº 5028, 97-99, 1991.
59. MUTURAJU, S.; MAITI, P.; SOLANKI, P.; SHARMA, A.K.; AMITABH; SINGH, S.B., PRASAD, D.; LLAVAZHAGAN, G.. Acetylcholinesterase inhibitors enhance cognitive functions in rats following hypobaric hypoxia. **Behavioural brain research**, 203, nº 1, 1-14, 2009.
60. National Institutes of Health. (julho 2011). National Institute on Aging – **National Institutes of Health**: Disponível em: <[http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/alzheimers\\_disease\\_fact\\_sheet\\_0.pdf](http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/alzheimers_disease_fact_sheet_0.pdf)>. Acesso em maio de 2013.
61. NIE, Q.; DU, X.G.; GENG, M.Y.. Small molecule inhibitors of ~~amilóide~~ amilóide beta peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease. **Acta Pharmacologica Sinica**, 32, 545-551, 2011.
62. NIELSBERTH, C.; DANIELSSON, A.W.; ECKMAN, C.B.; CONDRON, M.M.; AXELMAN, K.; FORSELL, C.; STENH, C.; LUTHMANN, J.; TEPLow, D.B.; YOUNKIN, S.G.; NÄSLUND, J.; LANNFELT, L.. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A-beta protofibril formation. **Nature Neuroscience**, 4, 887-893, 2001.

63. ORHAN, I. E.. Potential of natural products of herbal origin as monoamine oxidase inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, 22, nº 3, 268-276, 2016.
64. PARSONS, C.G.; STÖFFLER, A.; DANYSZ, W.. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis that glutamatergic system – too little activation is bad, too much is even worse. **Neuropharmacology**, 53, nº 6, 699-723, 2007.
65. PETERSON, G.L.. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, 83, 346-356, 1977.
66. PUZZO, D.; VITOLO, O.; TRINCHESE, F.; JACOB, J.P.; PALMIERI, A.; ARANCIO, O.. Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity. **Journal Neuroscience**, 25, nº 29, 6887-6897, 2005.
67. SAIDO, T.C.; IWATSUBO, T.; MANN, D.M.; SHIMADA, H.; IHARA, Y.; KAWASHIMA, S.. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. **Neuron**, 14, nº 2, 457-466, 1995.
68. SAYRE, L.M.; PERRY, G.; HARRIS, P.L.; LIU, Y.; SCHUBERT, K.A.; SMITH, M.A.. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. **Journal of the Neurochemistry**, 74, nº 1, 270-279, 2000.
69. SECCI, D.; CARRADONI, S.; BOLASCO, A.; CHIMENTI, P.; YÁÑES, M.; ORTUSO, F.; ALCARO, S.. Synthesis and selective human monoamine oxidase inhibition of 3-carbonyl, 3-acyl, and 3-carboxyhydrazido coumarin derivatives. **European Journal Medicine Chemistry**, 46, 4846-4852, 2011.
70. SELKOE, D.; MANDELKOW, E.; HOLTZMAN, D.. Deciphering Alzheimer's disease. **Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine**, 2, 1-8, 2012.
71. SELKOE, D.J.. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. **Journal Biological Chemistry**, 27, nº 31, 18295-8, 1996.
72. SERRANO-POZO, A.; FROSCHE, M.P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B.T.. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 1-24, 2011.
73. SMITH, M.A.; WEHR, K.; HARRIS, P.L.; SIEDLAK, S.L.; CONNOR, J.R.; PERRY, G.. abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. **Brain Research**, 788, nº 1-2, 232-236, 1998.
74. SMITH, M.A.C.; **Revista brasileira de psiquiatria**, 21, 03, 1999.
75. SOREGHAN, B.; KOSMOSKI, J.; GLABE, C.. Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation. **Journal Biological Chemistry**, 269, nº 46, 28551-28554, 1994.

76. SPIRES, T.L.; HYMAN, B.T.. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. **Neuro Rx**, 2, n° 3, 423-437, 2005.
77. SUCHER, N.J.; AWOBULUYI, M.; CHOI, Y.B.; LIPTON, S.A.. NMDA receptors: from genes to channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, 17, n° 10, 349-355, 1996.
78. TABATON, M.; NUNZI, M.G.; XUE, R.; USIAK, M.; AUTILIO-GAMBETTI, L.; GAMBETTI, P.. Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 200, n° 3, 1598-1603, 1994.
79. TÔUGU, V.; KARAFIN, A.; PALUMAA, P.. Binding of zinc(II) and copper (II) to the full-length Alzheimer's amyloid-beta peptide. **Journal Neurochemistry**, 104, n° 5, 1249-1259, 2008.
80. WALSH, D.M.; KLYUBIN, I.; FADEEVA, J.; CULLEN, W.K.; ANWYL, R.; WOLFE, M.S.; ROWAN, M.J.; SELKOE, D.J.. Naturally secreted oligomers of amyloid beta-protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, 416, 535-539, 2002.
81. WEINER, M.W.; VEITCH, D.P.; AISEN, P.S.; BECKETT, L.A.; CAIRNS, N.J.; GREEN, R.C.; HARVET, D.; JACK, C.R.; JAGUST, W.; LIU, E.; MORRIS, J.C.; PETERSEN, R.C.; SAYKIN, A.J.; SCHMIDT, M.E.; SHAW, L.; SIUCIAK, J.A.; SOARES, H.; TOGA, A.W.; TROJANOWSKI, J.Q.. The Alzheimer's disease neuroimaging initiative: a review of papers published since its inception. **Alzheimer's & Dementia**, 8, n° 1, S1-S68, 2012.
82. WILCOCK, G.K.; ESIRI, M.M.; BOWEN, D.M.; SMITH, C.C.T.. Alzheimer's disease: correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. **Journal of the Neurological Sciences**, 57, n° 2-3, 407-417, 1982.
83. WISHIK, C.M.; NOVAK, M.; EDWARDS, P.C.; KLUG, A.; TICHELAAAR, W.; CROWTHER, R.A.. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 4884, 1988.
84. YANG, D.S.; McLAURIN, J.; QIN, K.; WESTAWAY, D.; FRASER, P.E.. Examining the zinc binding site of the amyloid-beta peptide. **European Journal Biochemistry**, 267, n° 22, 6692-6698, 2000.
85. YODIM, M.B.; BAKHLE, Y.S.. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **British Journal Pharmacology**, 147, 287-296, 2006.
86. YODIM, M.B.; WEINSTOCK, M.. Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. **Neurotoxicology**, 25, n° 1-2, 243-250, 2004.
87. ZHENG, W.H.; BASTIANETTO, S.; MENNICKEN, F.; MA, W.; KAR, S.. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. **Neuroscience**, 115, n° 1, 201-211, 2002.

88. ZHU, X.; SU, B.; WANG, X.; SMITH, M.A.; PERRY, G.. Causes of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 64, n° 17, 2202-2210, 2007.