



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA PRETTO MORAES

COMPUTAÇÃO BIOLÓGICAMENTE INSPIRADA
APLICADA AO ESTUDO DA
INTERAÇÃO DA MONOAMINA OXIDASE E INIBIDORES

Porto Alegre

2011

FERNANDA PRETTO MORAES

COMPUTAÇÃO BIOLÓGICAMENTE INSPIRADA APLICADA AO ESTUDO DA
INTERAÇÃO DA MONOAMINA OXIDASE E INIBIDORES

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-graduação em Medicina
e Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr

Porto Alegre

2011

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

M827c Moraes, Fernanda Pretto

Computação biologicamente inspirada aplicada ao estudo da interação da monoamina oxidase e inibidores / Fernanda Pretto Moraes. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

163 f.: gráf. il. tab. Inclui um artigo científico submetido para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Junior.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular.

1. INIBIDORES DA MONOAMINOXIDASE. 2. DOENÇA DE PARKINSON/terapia. 3. DEPRESSÃO/terapia. 4. ANTIDEPRESSIVOS. 5. MONOAMINAS BIOGÊNICAS. 6. OXIRREDUTASES. 7. DESAMINAÇÃO. 8. OXIDASES. 9. NEUROQUÍMICA. 10. ISOFORMAS DE PROTEÍNAS. 11. SIMULAÇÃO POR COMPUTADOR. 12. MODELOS TEÓRICOS. I. Azevedo Junior, Walter Filgueira. II. Título.

C.D.D. 574.192
C.D.U. 577.13:615.214 (043.3)
N.L.M. QV 77.5

FERNANDA PRETTO MORAES

COMPUTAÇÃO BIOLÓGICAMENTE INSPIRADA APLICADA AO ESTUDO DA
INTERAÇÃO DA MONOAMINA OXIDASE E INIBIDORES

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-graduação em Medicina
e Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Dr.^a. Maria Martha Campos (PUCRS)

Dr. Luiz Augusto Basso (PUCRS)

Dr. Hermes Luís Neubauer de Amorim (ULBRA)

Porto Alegre

2011

Dedico este trabalho aos meus pais,
que tanto apoiaram e incentivaram
o meu crescimento profissional.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a Deus, que todos os dias da minha vida me deu forças para nunca desistir.

Agradeço ao meu orientador, o professor Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr por permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa, o Laboratório de Bioquímica Estrutural (LaBioQuest), por aceitar me orientar no mestrado e pelo apoio durante os dois anos em que este projeto se desenvolveu, sempre incentivando e orientando em busca do conhecimento científico e na minha formação como pesquisadora e pessoa.

A minha família, como um todo, pelo incentivo, especialmente aos meus pais, Ayrton B. Moraes e Eli Maria Pretto Moraes, ao meu irmão Felipe, a minha avó Tereza (*in memoriam*), e as minhas tias Anir e Genir; que sempre me deram força e subsídios para eu seguir em frente, além de carinho e paciência.

Ao meu namorado Décio, pelo amor, apoio, incentivo, carinho e pela compreensão demonstrada nestes dois últimos anos.

Eu gostaria de agradecer a todos os meus colegas do laboratório, os novos e os antigos, pela ajuda, incentivo, amizade e companheirismo, principalmente aos colegas Me. Rafael Caceres e Me. Luís Fernando Timmers.

Agradeço também a minha colega e, acima de tudo, amiga, Kelen Rocha. Ela que foi minha companheira na realização de todos os experimentos. Agradeço muito a ti, Kelen por compartilhar todo o teu conhecimento comigo e por me dar o prazer de tê-la como amiga.

Eu não poderia deixar de salientar a importância de algumas pessoas, pois elas foram fundamentais durante o desenvolvimento desta dissertação, pois sempre estiveram por perto, ajudando e principalmente descontraído nos momentos difíceis, todas as gurias do pensionato, as minhas amigas, Elisa Chequeller, Karen Bazzo, Tathyana Mar Amorim, Luciele Gonzaga, Franciele Dietrich, Milene Pufal, Juliane Coracini, Priscila Vitola e Diana Rostirolla. Um muito obrigado pelas risadas e momentos de descontração.

Não poderia deixar de agradecer a minha amiga Luana Vitória Haas que esteve presente em todos os momentos, nos sorrisos e nas lágrimas, me apoiando, me dando forças para continuar, sempre pronta para tudo, sempre ao meu lado. Muito obrigada Lu!

Aos professores do curso pelos ensinamentos e por contribuírem com a minha formação.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

Resumidamente, muito obrigada a todos!

"Confie em seu coração se os
mares explodirem em chamas
E viva pelo amor, mesmo que
as estrelas se movam para trás".

E. E. Cummings

Resumo

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurológica intrigante que afeta a população em geral, atacando principalmente nos países em desenvolvimento. Com isso, cria-se a necessidade da descoberta de agentes terapêuticos para o tratamento da DP. A monoamina oxidase (MAO) é uma enzima de grande importância na neuroquímica, pois catalisa a desaminação oxidativa de aminas biogênicas, como monoaminas neurotransmissoras e neuromoduladoras, assim como monoaminas bioativas exógenas. Com base na especificidade a substrato e inibidores, são descritas duas isoformas da MAO (A e B). Devido aos seus papéis no metabolismo das catecolaminas neurotransmissoras, MAO-A e MAO-B são consideradas farmacologicamente interessantes, e inibidores reversíveis e irreversíveis destas isoformas são usados clinicamente para tratar doenças neurológicas incluindo a DP. Nos últimos 15 anos, desde a demonstração que sítios I₂ estão associados com frações da membrana mitocondrial, muitos estudos provem evidências de que estes sítios representam regiões da MAO. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que derivados imidazolínicos são capazes de inibir a atividade da MAO. Este efeito tem sido atribuído a sítios I₂ de alta afinidade na MAO-B (I_{2B}) e a um sítio similar de baixa afinidade na MAO-A (I_{2A}). Estudos cristalográficos identificaram o domínio da ligação imidazolínica sobre monoamina oxidase B (MAO-B), que abre a possibilidade de estudos de *docking* molecular voltadas para este sítio de ligação. Assim, este estudo teve como objetivo identificar novos potenciais inibidores da MAO-B. Também estamos interessados em estabelecer uma metodologia computacional rápida e confiável para futuras simulações de *docking* molecular focadas no sítio imidazolínico de ligação desta enzima. Foi utilizado o programa 'Molegro Virtual Docker' (MVD) em todas as simulações aqui descritas. Todos os resultados indicaram que o algoritmo *simplex evolution* é capaz de simular com sucesso as interações proteína-ligante para MAO-B; e que uma função de escore (MOLDOCK *score*) implementada no programa MVD apresenta alto coeficiente de correlação com a atividade experimental.

Palavras Chaves: Depressão, Doença de Parkinson, MAO-A e MAO-B, sítios imidazolínicos, *docking* molecular, *Virtual Screening*.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a intriguing neurological disorder that affects the general population, attacking mainly in developing countries. This, it creates the need for discovery of therapeutic agents for the treatment of PD. Monoamine Oxidase (MAO) is an enzyme of major importance in neurochemistry, it catalyzes the oxidative deamination of biogenic amines, such as monoamine neurotransmitters and neuromodulators, as well as exogenous bioactive monoamines. On the basis of their substrate and inhibitor specificities, two isoforms of MAO have been described (A and B). Due to their role in the metabolism of catecholamines neurotransmitters, MAO-A and MAO-B have long been of pharmacological interest, and reversible and irreversible inhibitors of these isoforms are used clinically to treat neurological diseases including PD. Since the demonstration that I2-imidazoline sites are associated with mitochondrial membranes 15 years ago, several studies have provided evidence that these sites represent regions on MAOs. In line with this view, it has been demonstrated that imidazoline derivatives inhibit MAO activity. This effect has been attributed to a high affinity I2 binding site on MAO-B (I2B) and to a similar lower affinity site on MAO-A (I2A). Crystallographic studies have identified the field of imidazoline binding on monoamine oxidase B (MAO-B), which opens the possibility of molecular docking studies devoted to this binding site. Thus, this study aimed to identify new potential inhibitors of MAO-B. We are also interested in establishing a fast and reliable computational methodology for future molecular docking simulations focused on the imidazoline binding site of this enzyme. We used the program 'Molegro Virtual Docker' (MVD) in all simulations described here. All results indicated that the simplex algorithm evolution is able to successfully simulate the protein-ligand for MAO-B, and a function score (score MOLDOCK) implemented in the program MVD has a high correlation coefficient with the experimental activity.

Keywords: Depression, Parkinson's disease, MAO-A and MAO-B, imidazoline sites, *docking* molecular, *virtual screening*.

Lista de abreviaturas e Siglas

- PD**, Parkinson's disease
- IMAO**, inibidor da monoamina oxidase
- MAO**, Monoamine Oxidase
- MAO-A**, Monoamine Oxidase A
- MAO-B**, Monoamine Oxidase B
- FAD**, Flavin-Adenine-Dinucleotide;
- VS**, Virtual Screening
- 2-BFI**, 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline
- MVD**, Molegro Virtual Docker
- RMSD**, Desvio Médio Quadrático
- PDB**, Protein Data Bank
- AE**, Algoritmo Evolucionário
- RO5**, Lipinski's rule of five
- ρ , Coeficiente de Spearman
- IUPAC**, International Union of Pure and Applied Chemistry
- IC50**, Metade da concentração máxima inibitória
- BHE**, Barreira-Hemato-Encefálica
- MPTP**, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
- MPP+**, 1-metil-4-fenilpirinium
- H2O2**, peróxido de hidrogênio
- SNP**, Sistema Nervoso Periférico
- SNC**, Sistema Nervoso Central
- 5-HT**, 5-hidroxitriptamina
- DDC**, dopa descarboxilase
- TH**, tirosina hidroxilase
- L-DOPA**, L-3,4-dihydroxyphenylalanine
- RVL**, medula rostral ventrolateral
- DA**, dopamina
- 5-HTP**, 5-hidroxitriptofano
- CDS**, substância deslocadora de clonidina
- KATP**, canais de potássio sensíveis à ATP
- ATP**, Adenosina Trifosfato

[³H]-PAC, [³H] - *para*aminoclonidina

GTP, guanosina trifosfato

Lista de Ilustrações

- Figura 1.** Mecanismo de neurotoxicidade induzido por ferro e peróxido de hidrogênio, via reação de Fenton.
- Figura 2.** Estrutura da MAO-A (A) e da MAO-B (B) humanas.
- Figura 3.** Estrutura do cofator FAD em 3D, presente no sítio ativo da MAO-B.
- Figura 4.** Visão estereoscópica da estrutura tridimensional da MAO-B.
- Figura 5.** Vias de síntese de dopamina nos neurônios dopaminérgicos e metabolismo pela MAO-A e B no cérebro.
- Figura 6.** Estruturas químicas de inibidores irreversíveis da MAO.
- Figura 7.** A “reação do queijo”.
- Figura 8.** Estruturas químicas de inibidores reversíveis da MAO.
- Figura 9.** Estrutura química do núcleo imidazólico e da clonidina.
- Figura 10.** Estrutura dos possíveis ligantes endógenos dos sítios imidazólicos.
- Figura 11.** Estrutura química do 2-BFI.
- Figura 12.** Fluxograma do *virtual screening*.
- Figura 13.** Esfera de *docking* utilizada nas simulações de *re-docking*
- Figura 14.** Estruturas moleculares dos 8 ligantes
- Figura 15.** Ligplot do ZINC00154386 demonstrando as ligações de hidrogênio e os contatos hidrofóbicos feitos pelo ligante 2BFI com a enzima MAO-B.
- Figura 16.** Ligplot do ZINC02387301 demonstrando as ligações de hidrogênio e os contatos hidrofóbicos feitos pelo ligante 2BFI com a enzima MAO-B.
- Figura 17.** Ligação do 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline com resíduos principais encontrados em interações intermoleculares com o 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline.

Lista de Tabelas

Tabela 1. RMSD para todos os 16 protocolos de *docking*.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos ligantes que passaram pela Regra de Lipinski, após a análise por FAFDrugs.

Tabela 3. Comparação de valores de IC50 de vários derivados da MAO testados com energia de interação para *docking* experimental.

Tabela 4. Interações intermoleculares para os ligantes selecionados com melhor score no processo de VS.

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Avaliação do virtual screening comparando os ligantes e suas frequências.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Doença de Parkinson	16
1.2 Monoamina Oxidase	17
1.3 Desenvolvimento de Inibidores da MAO	24
1.4 Sítios Imidazólicos	30
1.5 Sítios Imidazolínicos I ₂	33
1.5.1 Relação Funcional entre Sítios I ₂ e MAO	35
1.6 Desenvolvimento de Drogas e Computação Bio-Inspirada	37
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 <i>Docking</i> molecular	45
4.2 <i>Re-docking</i> e <i>Cross-Docking</i>	46
4.3 <i>Virtual Screening</i>	47
4.4 Coeficiente de Spearman	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 <i>Re-docking</i> e <i>cross-docking</i>	53
5.2 <i>Virtual Screening</i>	57
5.3 Coeficiente de Spearman	60
5.4 Interações moleculares	62
6. CONCLUSÃO	69

REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	85
ANEXO A Targeting imidazoline site on monoamine oxidase B through molecular docking simulations	87
ANEXO B Recent progress of molecular docking	120
simulations applied to development of drugs	

Capítulo 1

Introdução

- 1.1 Doença de Parkinson
 - 1.2 Monoamina Oxidase
 - 1.3 Desenvolvimento de inibidores da MAO
 - 1.4 Sítios Imidazolínicos
 - 1.5 Sítios Imidazolínicos I2
 - 1.5.1 Relação Funcional entre Sítios I2 e MAO
 - 1.6 Desenvolvimento de Drogas e Computação Bio-Inspirada
-

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP), descrita por James Parkinson em 1817, é uma das doenças neurológicas mais comuns e intrigantes dos dias de hoje. É uma doença neurodegenerativa com uma etiologia complexa e multifatorial, de distribuição universal e atinge todos os grupos étnicos e classes sócio-econômicas. Estima-se uma prevalência de 100 a 200 casos por 100.000 habitantes. Sua incidência e prevalência aumentam com a idade. A prevalência da DP no Brasil não é conhecida (**Farrer, 2006**).

Do ponto de vista patológico, a DP é uma doença degenerativa caracterizada por morte de neurônios dopaminérgicos da substância nigra e por inclusões intracitoplasmáticas destes neurônios, conhecidas como corpúsculos de *Lewy*. As manifestações clínicas da DP incluem tremor de repouso, bradicinesia, rigidez roda dentada e anormalidades posturais (Paulson *et al.*, 1996). Como é uma doença progressiva, que usualmente acarreta incapacidade severa após 10 a 15 anos, o impacto social e financeiro é elevado, particularmente na população mais idosa (**Bennett *et al.*, 1996**). É estimado que o custo anual mundial com medicamentos antiparkinsonianos esteja em torno de 11 bilhões de dólares, sendo cerca de 3 a 4 vezes mais caro para os pacientes na fase avançada da doença (**Dodel *et al.*, 1998; Siderowf *et al.*, 2000**).

Foi somente na década de 1960, após a identificação das alterações patológicas e bioquímicas no cérebro de pacientes com DP, que surgiu o primeiro tratamento com sucesso, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas terapias efetivas. A introdução da levodopa representou o maior avanço terapêutico na DP, produzindo benefícios clínicos para praticamente todos os pacientes e reduzindo a mortalidade por esta doença. No entanto, logo após a introdução da mesma, se tornou evidente que o tratamento por longo prazo era complicado pelo desenvolvimento de efeitos adversos que incluem flutuações motoras, discinesia e complicações neuropsiquiátricas (**Lang *et al.*, 1998**).

Inibidores da monoamina oxidase (IMAOs), são alvos promissores para a descoberta de novos agentes terapêuticos para o tratamento da DP, porque devido aos seus papéis no metabolismo das catecolaminas neurotransmissoras, Monoamina Oxidase A (MAO-A) e Monoamina Oxidase B (MAO-B) são consideradas farmacologicamente interessantes; sendo que seus inibidores reversíveis e irreversíveis são utilizados clinicamente para tratar doenças neurológicas incluindo também a depressão (**Binda *et al.*, 2003**).

Neste Trabalho enfocamos a Monoamina Oxidase (MAO), uma enzima que contém Flavina-Adenina-Dinucleotídeo (FAD) e se constitui em um importante alvo molecular. Aqui são discutidos os aspectos estruturais e moleculares desta proteína, bem como de possíveis compostos inibidores identificados e analisados por técnicas computacionais como o *Docking Molecular*, *Re-docking*, *Cross-docking* e *Virtual Screening* (VS) ou triagem virtual de ligantes.

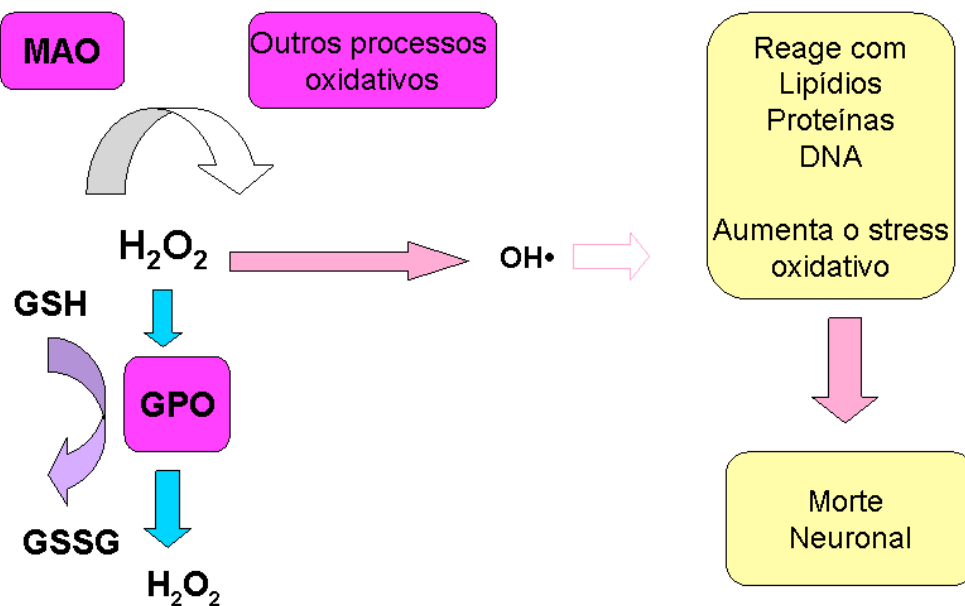
1.2 Monoamina Oxidase

Monoamina oxidase (MAO) (E.C: 1.4.3.4) é uma enzima que contém Flavina-Adenina-Dinucleotídeo (FAD) e está localizada na membrana externa da mitocôndria em neurônios, glia e outras células. Ela catalisa a desaminação oxidativa de aminas biogênicas, como monoaminas neurotransmissoras (serotonina, norepinefrina, dopamina) e neuromoduladoras (β -feniletilamina), assim como monoaminas bioativas exógenas (tiramina) (**Shih *et al.*, 1999**). Em tecidos neuronais, a MAO participa na regulação dos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos e regula os estoques intracelulares de monoaminas. Em tecidos periféricos, como intestino, fígado, pulmão e placenta, a MAO protege o organismo oxidando aminas provenientes do sangue ou prevenindo sua entrada na circulação sanguínea. Em microvasos da barreira-hemato-encefálica (BHE), por exemplo, a MAO possui função protetora agindo como barreira metabólica (**Youdim *et al.*, 2006a**). Além disso, esta enzima é responsável pela biotransformação de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) em 1-metil-4-fenilpirinium (MPP⁺), uma neurotoxina que causa Parkinson (**Tipton *et al.*, 1986**; **Fritz *et al.*, 1985**). Outros estudos mostram que a MAO participa em processos apoptóticos sendo que a inibição da sua atividade pode suprimir a morte neuronal (**De Zutter *et al.*, 2001**).

A reação catalisada pela MAO envolve a desaminação de monoaminas em aldeído e amônia (no caso de aminas primárias) e em aminas substituídas (no caso de aminas secundárias), com geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O H₂O₂, formado quando o cofator FAD é reoxidado pelo oxigênio, geralmente é inativado por enzimas como catalase e glutathione peroxidase. Entretanto, quando há um aumento na atividade ou expressão da MAO, o H₂O₂ em alta quantidade pode ser convertido por íons Fe²⁺ em radicais hidroxilas (OH•) altamente reativos (Figura 1). Estes radicais são capazes de provocar efeitos deletérios que podem causar dano e morte neuronal. Já o aldeído formado é rapidamente metabolizado pela enzima aldeído desidrogenase a metabólitos ácidos. Estes metabólitos ácidos (ácido 5-hidróxi-

3-indol acético a partir de 5-HT (5-hidroxitriptamina ou serotonina), ou ácido 3,5-diidróxifenil acético a partir de DA (dopamina) podem ser utilizados para medidas da atividade da MAO *in vitro* e *in vivo* (Youdim *et al.*, 2006b).

Figura 1 – Mecanismo de neurotoxicidade induzido por ferro e peróxido de hidrogênio, via reação de Fenton.



Fonte: Adaptado de Youdim *et al.*, 2006a.

Com base nas evidências de estudos conduzidos com vários inibidores, Jonhston (1968), concluiu que a MAO consiste de um sistema binário de enzimas, designadas MAO-A e MAO-B. Estas duas formas da MAO distinguem-se pela sua seletividade a substratos e inibidores, e distribuição tecidual. MAO-A é inibida irreversivelmente por baixas concentrações de clorgilina e catalisa preferencialmente a oxidação de serotonina (Fowler *et al.*, 1982), enquanto MAO-B é inativada irreversivelmente por baixas concentrações de selegilina (L-Deprenil) e preferencialmente oxida β -feniletilamina e benzilamina (Knoll & Magyar, 1972). A tiramina, a triptamina e a dopamina são igualmente metabolizadas por ambas as formas da enzima (Youdim *et al.*, 2006a). Entretanto, em humanos a dopamina é oxidada preferencialmente por MAO-B (Glover, 1977) e em roedores é oxidada pela MAO-A

(**Johnston 1968; Neff & Yang 1974**), mas na maioria das espécies ela pode ser metabolizada por ambas isoformas da enzima (**O'Carroll, 1983**).

Contudo, há numerosas exceções a essa regra pelo fato de a especificidade da MAO aos substratos depender da concentração, afinidade e renovação dos substratos, além de depender da concentração da enzima (**Tipton et al., 1987**).

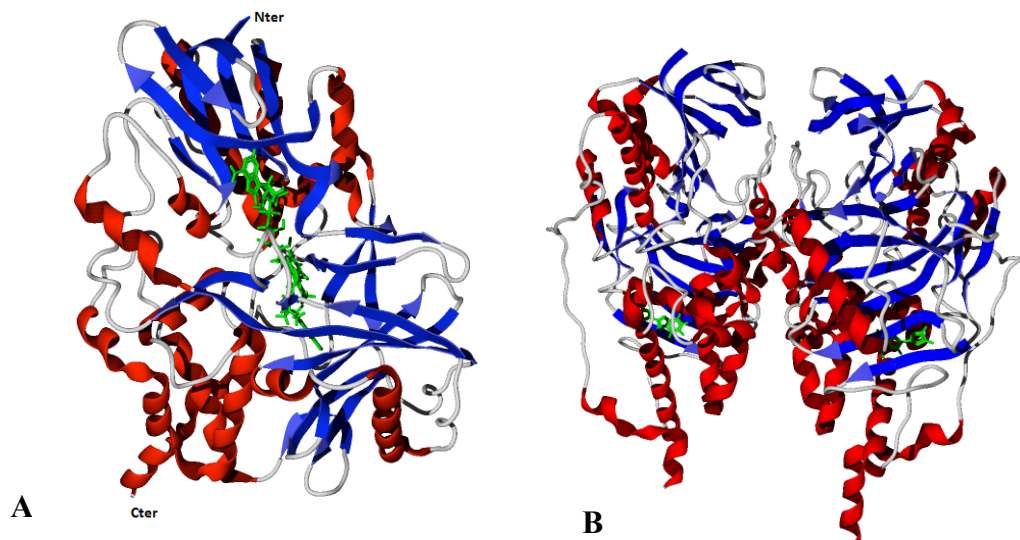
A distribuição da MAO no cérebro apresenta pequenas variações entre as espécies. MAO-A é, predominantemente, encontrada em regiões com alta densidade de neurônios catecolaminérgicos como locus ceruleus, substância negra e regiões periventriculares do hipotálamo. Além disso, MAO-A está co-localizada com a enzima dopamina-beta-hidroxilase, que converte dopamina em noradrenalina. Em contraste, estudos imunohistoquímicos mostram que neurônios serotoninérgicos (células do núcleo dorsal da *rafe*) e astrócitos contêm predominantemente MAO-B (**Westlund et al., 1985; Saura et al., 1996; Jahng et al., 1997**). Em relação a sua distribuição em tecidos periféricos, a MAO varia dentro de um mesmo organismo. Alguns tecidos como plaquetas de humanos ou rim e fígado de bovinos, apresentam maior quantidade de MAO-B (**Grimsby et al., 1990**). Já outros, como o intestino e a placenta humana e a tireóide de bovinos predomina MAO-A (**Sivasubramaniam et al., 2003; Nagatsu, 2004**).

As isoformas da MAO, MAO-A e MAO-B (Figura 2) são codificadas por dois genes diferentes, localizados no cromossomo X (Xp11.23), cada um compreendendo 15 éxons com idêntica organização introns-exóons (**Grimsby et al., 1991**), sugerindo que as isoformas são derivadas a partir de uma duplicação de um mesmo gene ancestral. MAO-A e MAO-B humanas são formadas por 527 e 520 aminoácidos, respectivamente, e apresentam 70% da seqüência de aminoácidos idêntica (**Bach et al., 1988**). A MAO-B tem um cofator, a FAD (Figura 3). Cofatores são substâncias não-proteicas que tomam parte das reações enzimáticas e são regeneradas para serem utilizadas em reações futuras (**Campbell, 2000**). A seqüência de aminoácidos da MAO-A de humanos (**Bach et al., 1988; Hsu et al., 1988**), bovinos (**Powell et al., 1989**) e ratos (**Kuwahara et al., 1990**) é altamente conservada (>87% idênticas). A seqüência de aminoácidos da MAO-B de humanos (**Bach et al., 1988**) e ratos (**Ito et al., 1988**) também é altamente conservada (88 % idênticas).

A partir da obtenção de formas cristalizadas das isoformas da enzima (**Binda et al., 2003; Ma et al., 2004; De Colibus et al., 2005; Son et al., 2008**) foi possível estabelecer a estrutura tridimensional das isoformas da MAO de ratos e de humanos, bem como predizer resíduos importantes para a formação do sítio ativo e os responsáveis pela especificidade à substratos e inibidores. A MAO-A de rato e a MAO-B humana cristalizam como dímeros,

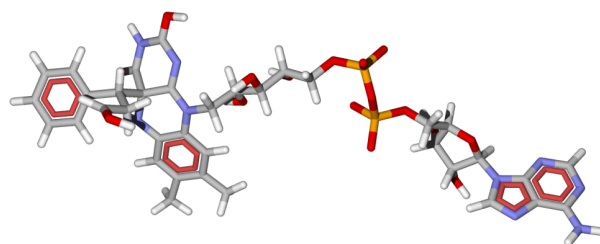
com similar interação monômero-monômero. No entanto, a MAO-A humana cristaliza como um monômero. Isto reflete a diferença de aminoácidos na posição 151 (a MAO-A de rato possui um resíduo de ácido glutâmico, enquanto a MAO-A humana possui uma lisina). Devido a esta mudança, a MAO-A humana resulta em um estado de monômero, pois este resíduo está presente na interface do dímero em MAO-A de rato e MAO-B de humanos (Andrés, 2004). Na figura 4, é apresentada a visão estereoscópica da estrutura tridimensional da MAO-B.

Figura 2- Estrutura da MAO-A (A) e da MAO-B (B) humanas.



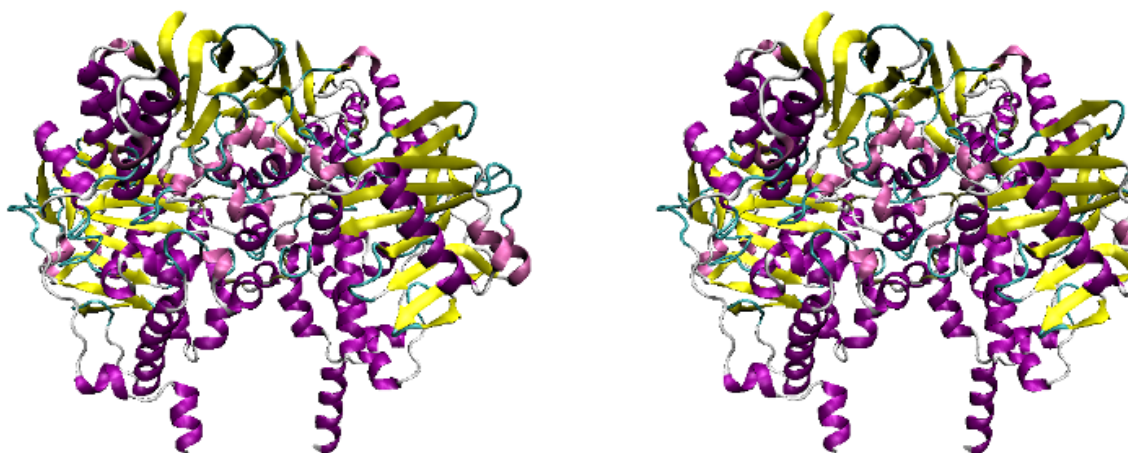
Fonte: Moraes (2011).

Figura 3- Estrutura do cofator FAD em 3D, presente no sítio ativo da MAO-B. A FAD participa do processo de deaminação oxidativa das monoaminas



Fonte: Moraes (2011).

Figura 4 – Visão estereoscópica da estrutura tridimensional da MAO-B.



Fonte: Moraes (2011).

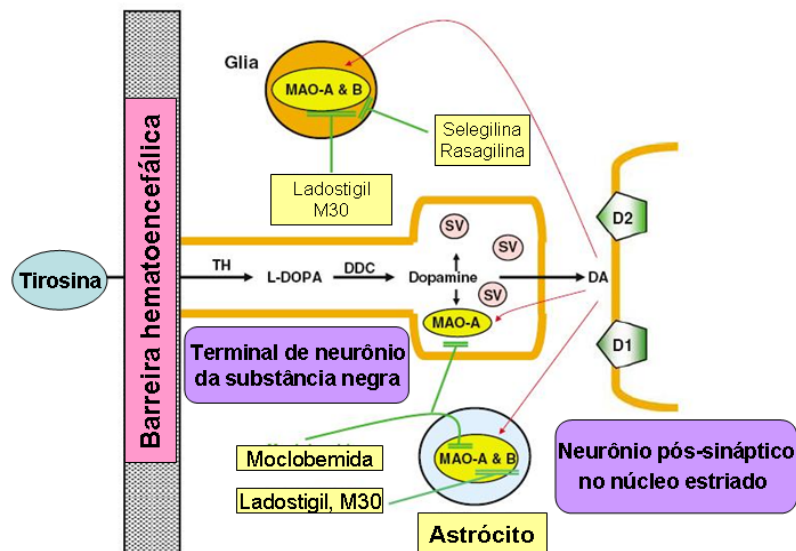
Monoamina Oxidase nos tecidos periféricos, como o intestino, fígado, pulmão e placenta parece proteger o organismo da oxidação de amins provenientes do sangue ou impedir a sua entrada na circulação. MAO-B nos microvasos da BHE presumivelmente, tem uma função similar de proteção, agindo como uma barreira metabólica. Tem sido sugerido que no Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Sistema Nervoso Central (SNC) intraneural, MAO-A e MAO-B protegem os neurônios a partir de amins exógenas, limitam as ações dos neurotransmissores aminínicos e regulam o conteúdo da reserva de amina intracelular (Youdim *et al.*, 2006a).

O baixo nível de MAO-A em neurônios serotoninérgicos sugere que as células da glia pode ter um papel importante na degradação de neurotransmissores 5-HT. Na verdade, os inibidores da MAO, mas não MAO-B tem demonstrado que o aumento do 5-HT cerebral tem atividade antidepressiva. Em contrapartida, o principal papel da MAO-B nos neurônios serotoninérgicos pode ser a de eliminar amins externas e minimizar o seu acesso a vesículas sinápticas. Em conjunto com a membrana da vesícula e os sistemas de captação de 5-HT, o que poderia contribuir para a pureza do 5-HT entregue à fenda sináptica (Youdim *et al.*, 2006a).

Neurônios noradrenérgicos contêm MAO-A e MAO-B, e noradrenalina é um substrato razoavelmente bom para ambas as formas da enzima. No entanto, devido a afinidade do mecanismo de captação vesicular de noradrenalina é muito superior ao seu K_m de MAO, a captação de noradrenalina em vesículas sinápticas devem ser fortemente favorecida em relação a degradação por MAO-A ou MAO-B. Um papel importante para MAO-A na desaminação de noradrenalina e dopamina em synaptosome do hipotálamo e corpo estriado, respectivamente, tenha sido relatado (Youdim *et al.*, 2006a).

Funções extraneuronais da MAO na inativação de aminas captada pelas células gliais e astrócitos (Figura 5). Os resultados dos estudos sobre o fluxo de dopamina e AMP cíclico induzida por D-anfetamina mostram que o metabolismo da dopamina extraneuronal por MAO-B pode ser importante quando a captação neuronal é prejudicada (Youdim *et al.*, 2006a).

Figura 5 - Vias de síntese de dopamina nos neurônios dopaminérgicos e metabolismo pela MAO-A e B no cérebro.



Fonte: Adaptado de Youdim *et al.*, 2006b.

Como visto na figura 5, a tirosina atravessa a barreira hematoencefálica e é hidroxilada pela tirosina hidroxilase (TH) para DOPA e, em seguida descarboxilada por DOPA

descarboxilase (DDC) à dopamina (DA) dentro do neurônio. A dopamina é retomada em vesículas sinápticas ou metabolizada pelo MAO-A na mitocôndria neuronal. Após o lançamento do terminal, a dopamina extracelular é desmarcada por captação em astrócitos e células gliais também contendo MAO-A e MAO-B. Inibição seletiva de uma isoforma da MAO permite que a outra metabolize dopamina de forma eficaz e não altera os níveis de dopamina no núcleo estriado. Por outro lado, a inibição não-seletiva de ambas as isoformas induz aumento altamente significativo de dopamina no estriado e em outras regiões do cérebro. Receptores de dopamina: D1 e D2 (**Youdim *et al.*, 2006b**).

Embora os papéis da MAO-A e MAO-B no encerramento das ações dos neurotransmissores e aminas da dieta têm sido estudadas extensivamente, menos atenção tem sido dada às funções dos produtos da atividade da MAO. O peróxido de hidrogênio formado durante a reação pode ter importantes funções metabólicas e de sinalização no cérebro, e os aldeídos derivados da desaminação da 5-HT e da noradrenalina podem estar envolvidos na regulação do sono. No entanto, em concentrações mais elevadas, os produtos da amônia e peróxido de hidrogênio são tóxicos. O aldeído derivado da dopamina, o que não parece se acumular no cérebro saudável, é citotóxico. Isso pode ser importante na doença de Parkinson, em que os níveis de aldeído desidrogenase na substância negra são muito reduzidos. Poderia também formar adutos com grupos amina para produzir compostos tóxicos, como tetrahydropapaveroline que têm sido associados com parkinsonismo e anormalidades do álcool. Desta maneira aldeídos podem também formar adutos com grupos amina para produzir compostos tóxicos, como tetrahydropapaveroline que têm sido associados com parkinson e anormalidades relacionadas ao álcool (**Youdim *et al.*, 2006a**).

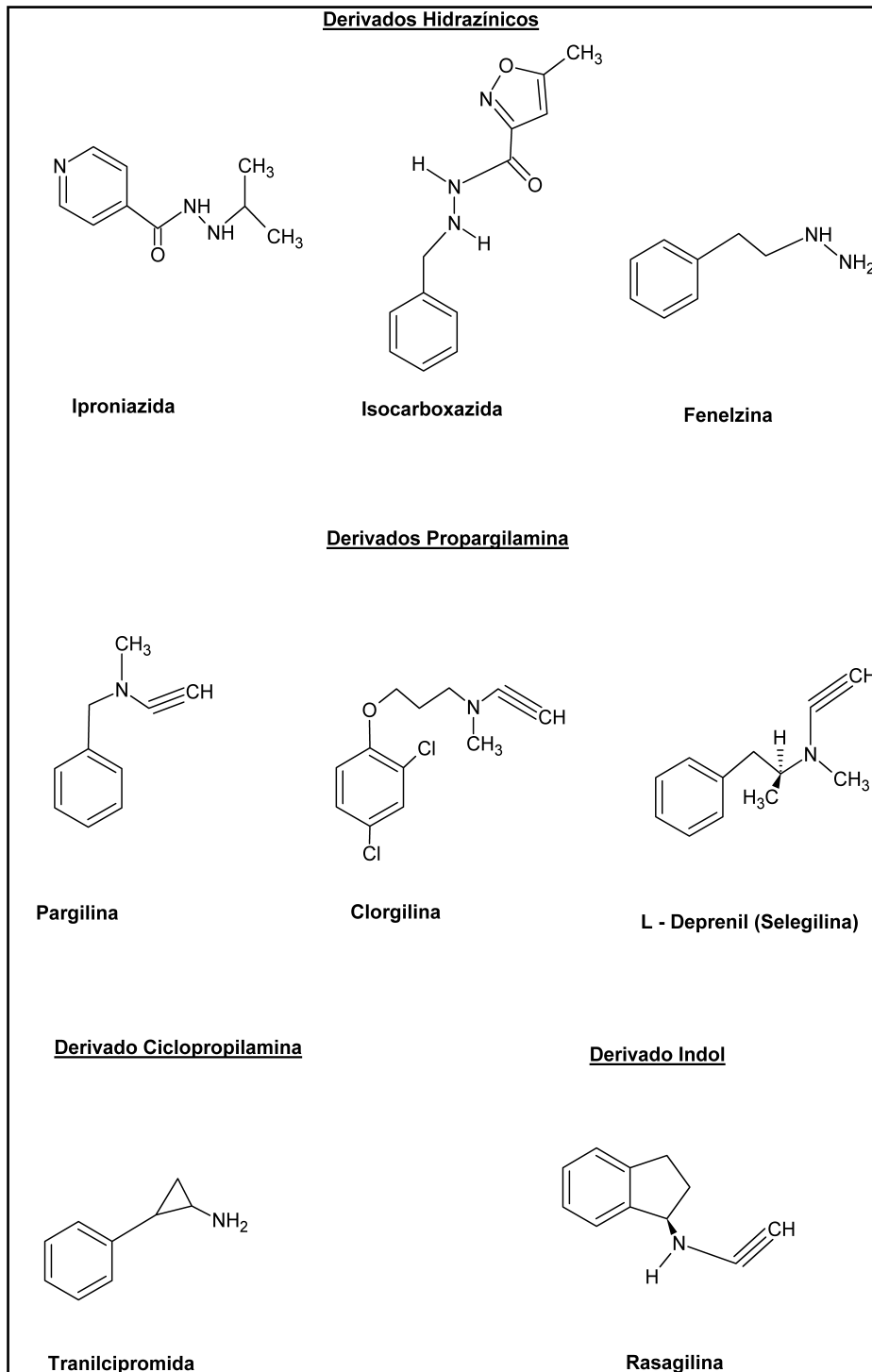
Há vários relatos de inibidores endógenos da MAO no líquido cefalorraquidiano e no cérebro, mas a maioria permaneceu inconclusivo. Por exemplo, o peptídeo neurocatin têm sido relatado como inibidor da MAO-A (molécula intacta). Moléculas de baixo peso molecular que podem atuar como inibidores da MAO endógena incluem derivados da isoquinolina, Harman, isatina, fosfatidilserina e o ácido quinolínico. No entanto, o significado fisiológico dos seus efeitos inibitórios permanece obscuro. Houve também vários relatos conflitantes sobre um inibidor endógeno de plaquetas MAO-B que é elevada em pacientes com esquizofrenia (**Youdim *et al.*, 2006a**).

1.3 Desenvolvimento de Inibidores da MAO

O primeiro inibidor da MAO introduzido na clínica foi a iproniazida (Figura 6). Ela foi sintetizada em 1951 como um análogo da isoniazida, uma droga usada no tratamento da tuberculose (**Selikoff *et al.*, 1952**). Mudanças no humor foram observadas durante o tratamento crônico de pacientes com tuberculose que recebiam a iproniazida. Estes efeitos de elevação do humor conduziram a uma triagem clínica em pacientes depressivos, que mostrou uma utilidade clínica da iproniazida como um fármaco antidepressivo (**Crane, 1956**).

A partir deste achado, durante os anos 1950 passou-se a desenvolver outros derivados hidrazínicos como inibidores da MAO para o tratamento da depressão, como a fenelzina e a isocarboxazida. Contudo, os relatos de toxicidade hepática, crises hipertensivas, de hemorragia e, em alguns casos, de morte, resultaram na retirada do mercado de muitos fármacos da primeira geração de inibidores da MAO. A toxicidade hepática, associada especificamente com inibidores derivados hidrazínicos, foi evitada pelo desenvolvimento de inibidores não-hidrazínicos, como trancilpromina e pargilina (Figura 6) (**Robinson, 2002**).

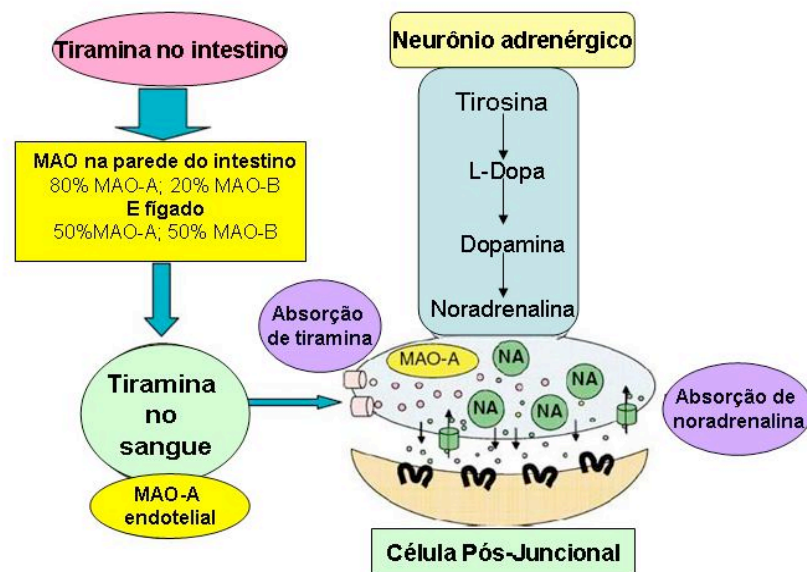
Figura 6 – Estruturas químicas de inibidores irreversíveis da MAO.



Fonte: Moraes (2011).

Entretanto, as crises hipertensivas continuaram a ocorrer. Este efeito colateral, chamado de “reação do queijo”, ocorre quando a tiramina e outras aminas simpatomiméticas, que são encontradas em alimentos fermentados como queijo (Da Prada *et al.*, 1988), entram na circulação, e potencializam a atividade cardiovascular simpática pela liberação de noradrenalina (Figura 7). Normalmente, estas aminas são metabolizadas pela MAO-A presente no intestino e no fígado. No entanto, com o uso de inibidores irreversíveis, a MAO-A fica constantemente inibida, inviabilizando o metabolismo destas aminas exógenas (Youdim & Weinstock, 2004).

Figura 7 – A "reação do queijo" - potencialização dos efeitos cardiovasculares da tiramina por inibidores irreversíveis da MAO.



Fonte: Adaptado de Youdim et al., 2006b.

Como visto na figura acima, normalmente, a tiramina na dieta sofre extensa inativação de “primeira passagem” pelas isoformas da MAO na parede intestinal e depois no fígado. A

tiramina que sobrevive entra na circulação sistêmica é ainda mais atenuada pela MAO em células endoteliais vasculares e pulmonares. No neurônio adrenérgico, a captação de tiramina inicia na liberação de noradrenalina, que representa os efeitos simpaticomiméticos de tiramina. Inibição irreversível da MAO-A, a isoforma predominante na periferia, permite que uma quantidade muito maior de tiramina entre na circulação sistêmica e, a partir daí, os neurônios adrenérgicos, conseqüentemente aumentam a liberação de noradrenalina e seu efeito. Por outro lado, inibidores reversíveis da MAO-A são deslocados da enzima por tiramina, que é então metabolizada pela enzima normalmente. Assim, a tiramina circulante, nunca atinge os níveis elevados resultantes da inibição irreversível da MAO (**Youdim et al., 2006b**).

A segunda geração de inibidores da MAO emergiu com a descoberta de inibidores seletivos para as formas A e B da enzima. Neste momento, surgiram dois importantes inibidores que auxiliam até hoje os estudos de inibição da MAO. Estes inibidores são a clorgilina e a selegilina (Figura 6), inibidores seletivos da MAO-A (**Johnston, 1968**) e MAO-B (**Knoll et al., 1965**), respectivamente. A clorgilina foi bastante utilizada como antidepressivo e ansiolítico (**Zisook, 1985**). Já a selegilina ainda é amplamente estudada e utilizada como adjuvante no tratamento da doença de Parkinson, em combinação com a L-DOPA (**Tetrud & Langston, 1989; Waters et al., 2004**). Diferentemente dos inibidores não-seletivos da MAO, os inibidores seletivos de MAO-B não apresentam efeitos colaterais como a reação do queijo, em razão do intestino conter pouco MAO-B e a tiramina ser efetivamente metabolizada pela MAO-A intestinal. No entanto a selegilina, por ser um análogo estrutural da anfetamina, é metabolizada *in vivo* em L-anfetamina e L-metanfetamina (**Reynolds et al., 1978**), metabólitos potencialmente tóxicos, possuindo ações simpatomiméticas semelhantes a anfetamina (**Simpson, 1978; Finberg et al., 1981**). A rasagilina (Azilect®, Indústrias Farmacêuticas Teva, Israel) (Figura 6) é também um inibidor seletivo e irreversível da MAO-B (**Youdim et al., 2001; Sterling et al., 1998**), pertencente à segunda geração de inibidores e, diferente da selegilina, é um derivado aminoindol que não gera metabólitos anfetamínicos (**Finberg & Youdim, 2002**). Muitos estudos têm comprovado a eficácia da rasagilina no tratamento da doença de Parkison, sendo aprovada desde 2005, em alguns países, como monoterapia ou como terapia adjuvante com L-DOPA (**Fernandez et al., 2007**).

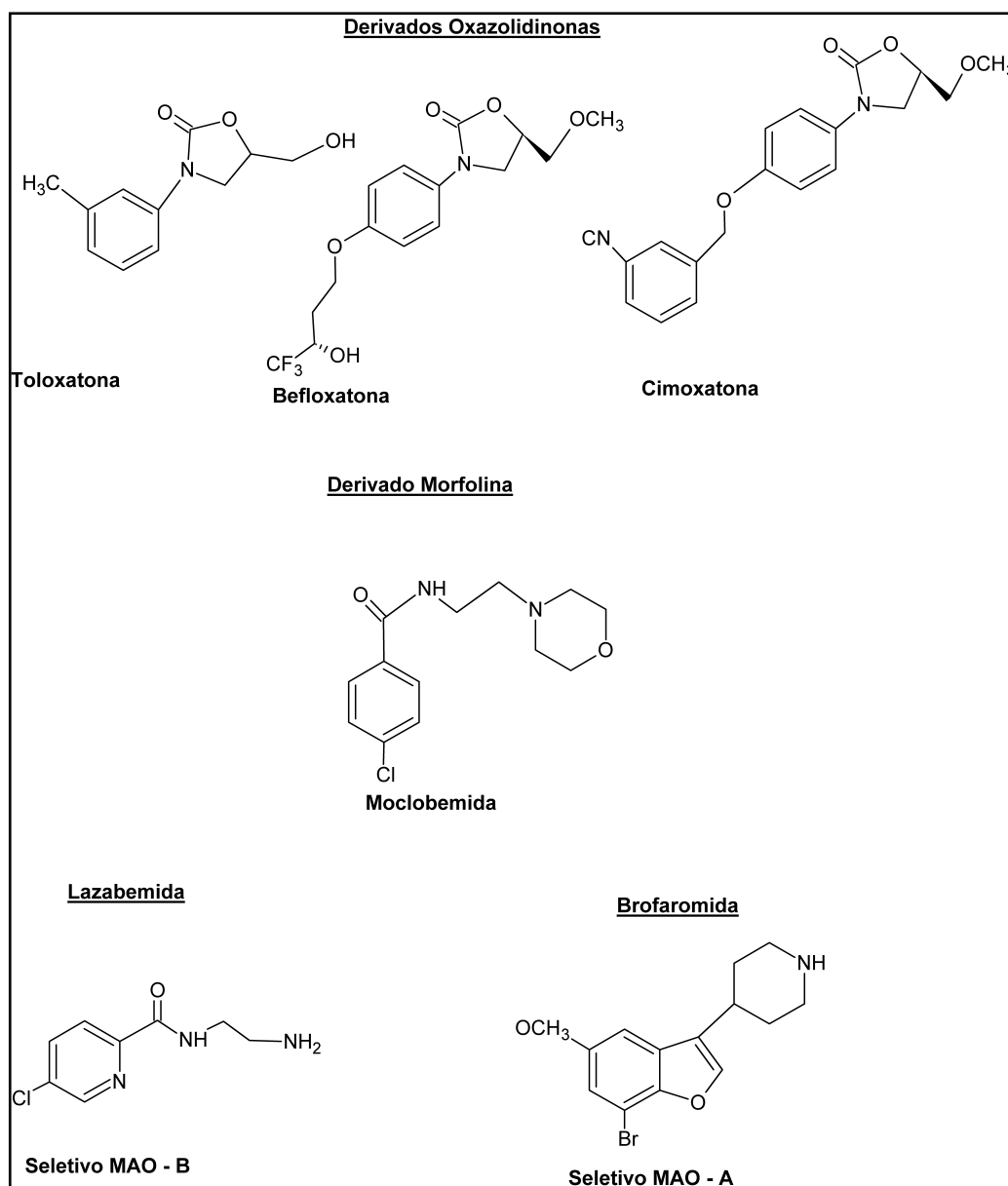
Todos os inibidores da MAO originais, da primeira e segunda geração, são inibidores enzimáticos irreversíveis. Estas substâncias ligam-se a MAO formando uma ligação covalente com o sítio ativo da enzima, destruindo definitivamente a função desta enzima (**Kearney et al., 1971; Bach et al., 1988**). A atividade enzimática só é restabelecida após a síntese de

novas moléculas de MAO. Algumas vezes estes inibidores são chamados "suicidas", porque, uma vez a enzima liga-se ao inibidor, este, em essência, comete suicídio, pois não mais exercerá sua função até que uma nova molécula da enzima seja sintetizada pela célula. Além disso, estes inibidores da MAO tendem a perder a seletividade inicial com doses maiores ou com administrações repetidas. Dessa forma, as ações produzidas pelo uso destes compostos podem ter limitações importantes na terapia, como efeitos nervosos centrais (insônia, irritabilidade, agitação, hipomania, supressão do sono REM), disfunções cardiovasculares (hipotensão ortostática), reações hipertensivas graves e distúrbios sexuais (**Cesura et al., 1992**).

Durante os anos 80, uma terceira geração de inibidores da MAO foi desenvolvida: os inibidores seletivos reversíveis. A partir de considerações teóricas, esperou-se que estes inibidores possuíssem alta seletividade ao longo de uma vasta faixa de doses e durante o uso crônico, induzindo mínimos efeitos adversos. O desenvolvimento de inibidores seletivos e reversíveis da MAO propiciou a perda de muitos efeitos colaterais, de nível central e periférico. Alguns inibidores da MAO-B reversíveis, como lazabemida (Figura 8) foram desenvolvidos (**Saura et al., 1994**).

A lazabemida é um inibidor altamente seletivo da MAO-B, e diferente da selegilina, não é metabolizado em compostos ativos (**Cesura et al., 1996**). Além disso, os inibidores da MAO-B são alvos de grandes pesquisas para o tratamento de doenças como Parkinson. Isto é devido a MAO-B, primeiramente, corresponder a 80% da atividade da MAO total em cérebro de humanos. Ainda, a MAO-B é a principal responsável pela degradação da β - feniletilamina, uma amina endógena que estimula a liberação de dopamina e inibe sua recaptção. Assim, a inibição da MAO-B possibilita um aumento nos níveis de dopamina, melhorando a transmissão dopaminérgica, tão prejudicada na doença e Parkinson (**Chen & Swope, 2005**).

Alguns inibidores reversíveis da MAO-A também foram desenvolvidos como a moclobemina, a toloxatona, a befloxatona, a cimoxatona e a brofaromida (Figura 8). Estes inibidores conseguem bloquear MAO-A no sistema nervoso central (SNC) suficientemente para obter efeitos antidepressivos, enquanto a tiramina provinda da dieta é capaz de deslocar o inibidor da MAO-A periférica, permitindo seu metabolismo (**Anderson et al., 1993**). No entanto, estes inibidores ainda desenvolvem outros tipos de reações adversas. No caso da moclobemida, por exemplo, estes efeitos adversos incluem: distúrbios do sono, aumento da ansiedade, agitação e dor de cabeça (**Yamada & Yasuhara, 2004**).

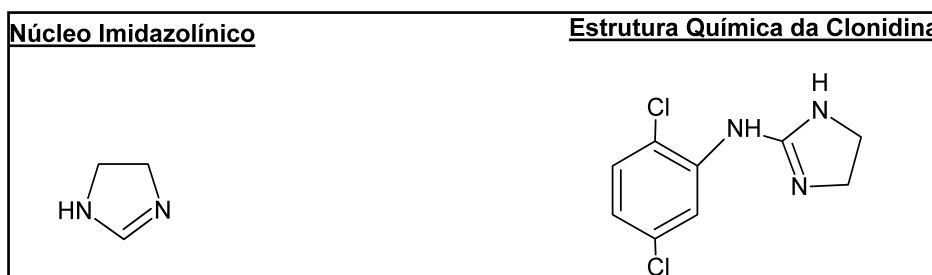
Figura 8 – Estruturas químicas de inibidores reversíveis da MAO.

Fonte: Moraes (2011).

1.4 Sítios Imidazólicos

A proposta da existência de sítios imidazólicos surgiu a partir de estudos realizados para entender as ações da clonidina (Figura 9), um agente antihipertensivo de ação central e quimicamente uma imidazolina. É descrito na literatura que vários compostos com núcleo imidazólico (Figura 9) ou guanidínicos podem possuir efeitos farmacológicos via interação com α_2 -adrenoceptores e sistemas de transporte de íons (Timmermans & Van Zwieten, 1982; Cantiello & Lanier, 1989). Entretanto, dados provenientes de uma série de abordagens diferentes, indicam a existência de proteínas de ligação que reconhecem seletivamente ligantes desta classe química e que podem contribuir para alguns efeitos farmacológicos obtidos por estes compostos.

Figura 9 – Estrutura química do núcleo imidazólico e da clonidina.



Fonte: Moraes (2011).

Uma das primeiras demonstrações da funcionalidade de sítios imidazólicos foi proposta por Bousquet e colaboradores em 1984 (Bousquet *et al.*, 1984). Neste estudo, os pesquisadores compararam as ações hipotensivas produzidas por microinjeções de uma série de agentes, entre eles a clonidina, que diferiam na estrutura química e/ou nas ações em receptores α_2 -adrenérgicos, no cérebro de gatos anestesiados. O local da injeção, a medula rostral ventrolateral (RVL), foi importante, pois esta região é o principal sítio de ação da clonidina na pressão arterial (Reis, 1995). Através de uma cuidadosa análise de estrutura-atividade, os autores concluíram que a hipotensão induzida pelas drogas não estava relacionada às ações dos agentes como agonistas de receptores α -adrenérgicos, mas sim a estruturas imidazólicas. Isto os levou a sugerir que deveria existir alguma forma de relação estrutura-atividade que indicaria a existência, nesta região do bulbo raquidiano, de sítios com preferência por estruturas imidazólicas (Bousquet *et al.*, 1984).

Nos anos subsequentes, a caracterização farmacológica, através de ensaios de ligação específica, veio corroborar o proposto por Bousquet. Em 1987, Ernsberger e colaboradores (**Ernsberger et al., 1987**) usando o radioligante [³H]- *para*-aminoclonidina ([³H]-PAC) revelou sítios, em cérebro de bovinos, que são operacionalmente diferentes de α_2 -adrenoceptores. No mesmo ano, Boyajian e colaboradores (**Boyajian et al., 1987**), em um estudo auto-radiográfico, reportaram que sítios marcados, no cérebro, por [³H]-idazoxan, um antagonista imidazolínico de receptores α_2 -adrenérgicos, foram mais abundantes que aqueles marcados por [³H]- rauwolscina, um antagonista não-imidazolínico altamente seletivo α_2 -adrenérgico. Dois anos depois, em 1989, Wikberg (1989) mostrou a presença de sítios de ligação não-adrenérgicos para [³H]-idazoxan em cérebro de porquinho-da-índia.

Entretanto, os sítios marcados por [³H]-idazoxan ou [³H]-PAC não reconhecem catecolaminas ou outros ligantes seletivos para receptores α_2 - adrenérgicos, possuindo propriedades farmacológicas distintas. Por exemplo, a clonidina e a fentolamina ligam com alta afinidade a sítios marcados por [³H]-PAC (**Ernsberger et al., 1987**), mas com baixa afinidade à sítios reconhecidos por [³H]-idazoxan (**Wikberg et al., 1990**). Em contraste, cirazolina, um composto imidazolínico, possui um perfil oposto. Embora se acredite que sítios reconhecidos por [³H]-clonidina ou [³H]-PAC e [³H]-idazoxan representem diferentes receptores, o consenso geral presente é de que estes sítios de ligação não-adrenérgicos estão estreitamente relacionados e são denominados genericamente como receptores imidazolínicos (**Atlas, 1991**), sítios com preferência à imidazolininas (**Bricca et al., 1989**), receptores imidazóis (**Ernsberger et al., 1987**) ou sítios receptivos à substâncias imidazolínicas e guanidínicas (IGRSs) (**Coupry et al., 1990**). Todavia, não se deve assumir que estes sítios representem receptores, mas sim que eles possam representar proteínas com outras funções, que também possuam regiões de reconhecimento para ligantes imidazolínicos.

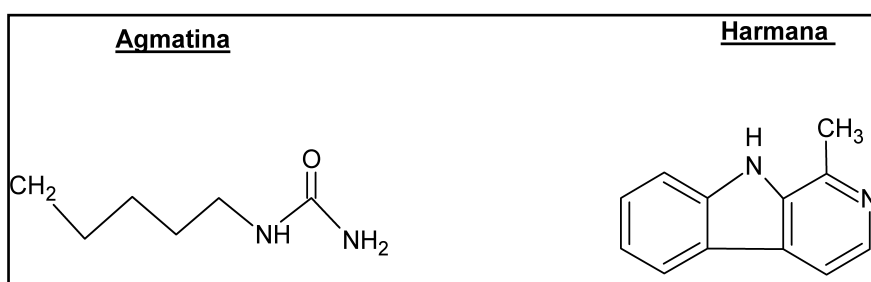
Um exame cuidadoso destes sítios sugere que eles são formados por pelo menos três populações, denominadas sítios imidazolínicos I₁, I₂ e I₃ (**Michel & Ernsberger, 1992; Morgan et al., 1995**). Cada família difere nas propriedades de reconhecimento de seus ligantes, na distribuição tecidual, e possivelmente na sua localização dentro da célula. Os sítios I₁, classicamente reconhecidos por clonidina, foram primariamente localizados no cérebro, em membranas plasmáticas celulares, e parecem estar associados com a regulação da pressão sanguínea (**Bousquet, 2001**). Os sítios I₂ apresentam uma maior distribuição, e estão associados com diversos papéis funcionais. Algumas evidências suportam uma associação com a enzima monoamina oxidase, creatina quinase e enzimas amina oxidases sensíveis a semicarbazida solúveis (**Tesson et al., 1995; Kimura et al., 2003; Holt et al., 2004**). Já a

terceira família destes sítios, os sítios imidazolínicos I₃, estão localizados nas células beta do pâncreas e estudos mostram que estes sítios parecem modular a secreção de insulina dependente de glicose (**Chan et al., 1991**), provavelmente via uma interação com canais de potássio sensíveis à ATP.

A identificação das três famílias de sítios imidazolínicos levanta questões sobre a existência de ligantes endógenos para estes novos sítios. Em 1984, Atlas e Burstein purificaram parcialmente uma substância do cérebro que deslocava [³H]- clonidina competitivamente, com alta afinidade. O material de estrutura desconhecida foi chamado de substância deslocadora de clonidina (CDS). Meeley e colaboradores (1986) confirmaram a presença de material semelhante à clonidina em cérebro de bovinos e foram os primeiros a demonstrar que o material pode ligar-se com alta afinidade não apenas à α 2-adrenoceptores, mas também em sítios imidazolínicos, agindo dessa forma como a “clonidina própria do cérebro”. Em 1994, uma molécula de estrutura conhecida com propriedades de ligação semelhantes a uma CDS foi isolada a partir de cérebro de bovinos. Esta molécula foi identificada sendo a agmatina (Figura 10) (**Li et al., 1994**).

No entanto, a agmatina é apenas uma das várias moléculas nativas que podem interagir com sítios imidazolínicos e que são tratadas como possíveis ligantes endógenos dos sítios imidazolínicos. Estudos mostraram que certas substâncias chamadas β -carbolinas exibem alta afinidade para sítios de ligação imidazolínicos I₁ e I₂ (**Hudson et al., 1999; Husbands et al., 2001**). Estes achados aliam-se ao fato de que algumas β -carbolinas que apresentam alta afinidade também são encontradas endogenamente em tecidos de mamíferos (Airaksinen & Kari, 1981), criando a possibilidade que elas possam representar ligantes endógenos para estes sítios.

Figura 10 – Estrutura dos possíveis ligantes endógenos dos sítios imidazolínicos.



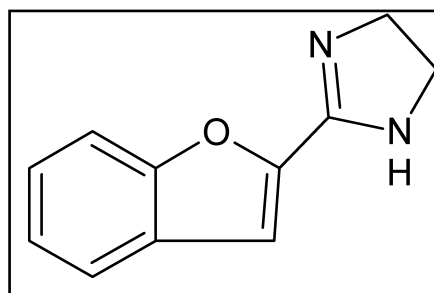
Fonte: Moraes (2011).

Além disso, nos últimos anos, muitos estudos vêm mostrando ações funcionais das β -carbolinas e sua relação com sítios imidazolínicos. Entre estes estudos, destacam-se suas ações sobre a modulação da temperatura corporal (Robinson *et al.*, 2003), capacidade de induzir respostas hipotensivas (Musgrave *et al.*, 2000), modulação dos níveis de monoaminas em regiões cerebrais específicas (Adell *et al.*, 1996; Hudson *et al.*, 1999), capacidade de reduzir parâmetros associados com síndrome de retirada da morfina (Hudson *et al.*, 1999; Cappendikj *et al.*, 1994), modulação da secreção de insulina e consumo de comida (Edwards, 2003; Rommelspacher *et al.*, 1977).

1.5 Sítios Imidazolínicos I₂

O avanço na descoberta de novos ligantes seletivos para sítios imidazolínicos I₂, proporcionou maior entendimento sobre a função, localização e distribuição destas proteínas. Um destes ligantes é o 2-BFI (Figura 11), que possui alta afinidade para sítios I₂ e tem sido usado para caracterizá-los em várias espécies incluindo humanos (Lione *et al.*, 1996; Hosseini *et al.*, 1997).

Figura 11 – Estrutura química do 2-BFI



Fonte: Moraes (2011).

Os sítios I₂ foram identificados em muitos órgãos, tecidos e tipos celulares, como córtex cerebral (Wikberg *et al.*, 1990), astrócitos (Regunathan *et al.*, 1993a), rim (Couprie *et al.*, 1990), fígado (Zonnenchein *et al.*, 1990), medula adrenal (Regunathan *et al.*, 1993b), plaquetas (Michel *et al.*, 1989), adipócitos (Mackinnon *et al.*, 1989), células pancreáticas (Chan *et al.*, 1995), próstata (Regunathan *et al.*, 1996), placenta (Diamant *et al.*, 1992),

uretra (**Yablonsky et al., 1991**), células vasculares (**Regunathan et al., 1996**). Além disso, estudos realizados com compostos guanidínicos, amilorida e guanabenz, demonstram que há dois subtipos de sítios I_2 : I_{2A} , sensível à amilorida; I_{2B} , insensível a amilorida (**Diamant et al., 1992; Miralles et al., 1993; Regunathan et al., 1993a; Olmos et al., 1999**).

No nível sub-celular, os sítios imidazolínicos I_2 estão associados à membrana da mitocôndria (**Tesson et al., 1991a; Limon-Boulez et al., 1992**). Esta localização não é comum, sendo compartilhada apenas por receptores benzodiazepínicos do tipo periférico. Entretanto, sítios I_2 e receptores benzodiazepínicos diferem, pois o composto PK11195, ligante com alta afinidade pelo último, não se liga a sítios I_2 (**Tesson et al., 1991a**). Embora muito bem distribuído, tanto no cérebro como em tecidos periféricos, os sítios I_2 não são expressos em todos os tecidos (**Tesson et al., 1992**), mesmo aqueles ricos em mitocôndrias. Assim, nem todas as mitocôndrias dos tecidos expressam sítios I_2 , indicando a variabilidade de alguns órgãos com respeito à localização subcelular.

Pouco se sabe a respeito dos mecanismos de transdução de sinal acoplados aos sítios I_2 . O fato de que a ligação aos sítios não é modificada por GTP (Guanosina trifosfato) ou seus análogos (**De Vos et al., 1994; Bricca et al., 1993**), que os sítios estão na mitocôndria, e que a exposição de tecidos a ligantes dos sítios falha em aumentar a acumulação de segundos mensageiros como nucleotídeos cíclicos ou fosfatos de inositol (**Regunathan et al., 1991**) indicam que este sítio não está acoplado à proteína G. Estudos mostram que o tratamento de células adrenais cromafins com ligantes dos sítios produz um lento aumento dose-dependente do influxo de cálcio (**Regunathan et al., 1991**), associado à liberação de catecolaminas, sugerindo que sítios I_2 possam regular cálcio intracelular, possivelmente por influenciar os estoques mitocondriais. Acredita-se, também, que outros íons possam estar envolvidos. Estudos com células tubulares proximais renais indicam que o idazoxan e a cirazolina inibem a reabsorção de sódio por mecanismos não-adrenérgicos (**Bidet et al., 1990**). Além disso, a ligação a sítios I_2 é sensível ao íon potássio ou a drogas que agem em canais de potássio (**Atlas, 1991**) sugerindo alguma associação com canais de potássio. Corroborando esta hipótese, estudos mostram que compostos imidazolínicos são capazes de regular canais de potássio sensíveis à ATP (KATP) em células pancreáticas (**Dunne, 1991; Ibbotson et al., 1993**).

Embora não esteja clara a função fisiológica destes sítios, alguns efeitos dos ligantes seletivos I_2 são relatados. Entre estes, destacam-se: indução de hiperplasia astrocítica em cérebro de ratos adultos (**Alemanly et al., 1995b**), redução da penumbra após isquemia cerebral global ou focal (**Gustafson et al., 1989; Maiese et al., 1992**); atenuação da tolerância

a antinocicepção induzida por opióides (**Boronat et al., 1998**); papel neuroprotetor (**Boronat et al., 1998**), aumento do consumo de alimento; entre outros.

1.5.1 Relação Funcional entre Sítios I₂ e MAO

A partir da demonstração que sítios de ligação imidazolínicos I₂ estão presentes na membrana mitocondrial externa (**Tesson et al., 1991b**), muitos estudos geraram evidências de que estes sítios estão relacionados com a enzima monoamina oxidase. Entre as evidências destacam-se as seguintes: 1) o peso molecular aparente dos dois subtipos de sítios I₂ (60-61 e 55 kDa) correspondem aos observados para MAO-A e MAO-B (**Lanier et al., 1993**); 2) as duas entidades são co-purificadas usando diferentes procedimentos cromatográficos (**Tesson et al., 1991a**); 3) a purificação parcial da seqüência de aminoácidos dos sítios I₂ indica homologia com a MAO (**Tesson et al., 1995**); 4) a expressão da MAO em cultura resulta na geração de sítios I₂ (**Tesson et al., 1995**); 5) proteínas de ligação imidazolínica I₂ foto-marcadas podem ser imunoprecipitadas com anticorpo monoclonal para MAO-A e MAO-B (**Raddatz et al., 1995**); 6) o inibidor irreversível da MAO, clorgilina, desloca com alta afinidade e irreversivelmente os sítios I_{2B} mas não o subtipo I_{2A} (**Olmos et al., 1993; 1996**); 7) tratamento crônico com vários inibidores irreversíveis da MAO causam uma diminuição na densidade (*downregulation*) de sítios I₂ em cérebro de ratos (**Olmos et al., 1993; Alemany et al., 1995a**); 8) a distribuição regional de sítios I₂, em cérebro de ratos e humanos, correlaciona-se com a de MAO-B, mas não com a de MAO-A, e a densidade de sítios I₂ e MAO-B, mas não MAO-A, aumenta em cérebro humano durante o processo de envelhecimento (**Sastre & García-Ssevilla, 1993; 1997**).

Outro fato que mostra a relação importante entre sítios I₂ e MAO, é a capacidade de ligantes I₂ inibirem de forma reversível a enzima (**Carpené et al., 1995; Ozaita et al., 1997; Lalies et al., 1999; Raasch et al., 1999**). Entretanto, concentrações relativamente altas de ligantes imidazolínicos são necessárias para provocar efeitos na atividade da enzima. Certos compostos imidazolínicos inibem de maneira não-competitiva a enzima, em concentrações de 100 a 1000 vezes mais alta que os valores de K_i determinados em estudos de radioligação para sítios imidazolínicos. (**Tesson et al., 1995; Carpené et al., 1995**). Embora esteja estabelecida uma importante associação dos sítios I₂ com MAO-A e MAO-B, a natureza exata desta interação ainda não está bem esclarecida (**Tesson & Parini, 1991b; Tesson et al., 1991a, 1995; Raddatz et al., 1995; Raddatz & Lanier, 1997a**). No entanto, a conclusão comum destes estudos propõe que cada subtipo de sítios I₂ encontra-se em determinada

isoforma da MAO. Sendo assim, os sítios I_{2B} representariam sítios de alta afinidade encontrados na MAO-B, entre os aminoácidos K149 e M222; enquanto, sítios de baixa afinidade, sítios I_{2A} , estariam presentes na MAO-A (**Raddatz *et al.*, 1995, 2000; Remaury *et al.*, 1999; 2000**).

Além disso, estudos mostram que os compostos imidazolinicos não agem como substratos da enzima e não competem com inibidores radio-marcados pela ligação na enzima (**Sastre & García-Ssevilla, 1993**). Por esta razão, os autores sugerem que o domínio de ligação I_2 na MAO não está localizado no sítio ativo da enzima, no grupo prostético FAD, ou no domínio de ligação de inibidores clássicos da MAO (**Raddatz *et al.*, 1995; Limon-Boulez *et al.*, 1996; Raddatz & Lanier, 1997a**). Acredita-se que os sítios I_2 na enzima representam sítios regulatórios ainda desconhecidos capazes de modular a atividade enzimática através de mecanismos inibitórios alostéricos (**Parini *et al.*, 1996**). Mais recentemente, foi relatado, que a maioria dos resíduos de aminoácidos identificados como I_2 na MAO-B foram obtidos na entrada da cavidade do sítio ativo da enzima, concordando com estudos cristalográficos (**Binda *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2004**). No entanto, há várias explicações possíveis para a observação que os sítios I_2 não são detectados igualmente em todos os tecidos que expressam a enzima MAO: 1) a existência de isoformas adicionais de monoamina oxidase, gerada por variantes de edição de RNAm (“splicing”), que diferem no domínio da enzima que reconhecem ligantes imidazolinicos; 2) modificações pós-traducionais da enzima em células específicas onde os sítios I_2 são seletivamente mascarados; 3) a existência de proteínas tecido-específicas que de forma alostérica influenciam a acessibilidade dos sítios I_2 ; e 4) a ocupação de sítios I_2 por ligantes endógenos que estão presentes em determinados tecidos (**Raddatz *et al.*, 1995**). Assim, ainda não está claramente estabelecida a relação entre a MAO e os sítios imidazolinicos. Contudo, acredita-se que de fato os sítios I_2 estão presentes em determinadas sub-populações da enzima (**Cesura *et al.*, 1996; Raddatz *et al.*, 1995, 1997a**). Portanto, sabendo que a localização dos sítios I_2 parece ser uma região crítica para a atividade da enzima, a manipulação específica da MAO, através destes sítios, representa um novo alvo terapêutico, dado o papel da enzima em várias doenças neurodegenerativas, do humor e comportamentais (**Foley *et al.*, 2000**).

1.6 Desenvolvimento de Drogas e Computação Bio-Inspirada

O desenvolvimento racional de novas drogas baseia-se no conhecimento detalhado da estrutura tridimensional da proteína alvo, no entendimento de sua interação com ligante e na racionalização de como o fármaco em potencial poderá interagir neste processo. Por esta razão, a análise da interação proteína-ligante torna-se fundamental para este processo e para a otimização de um fármaco líder, que deverá aliar as características de alta seletividade/especificidade e propriedades farmacocinéticas adequadas (**Thomsen & Christensen, 2006**).

A necessidade de prever a conformação de um inibidor no sítio ativo de uma enzima é preponderante para a compreensão das forças que guiam e estabilizam esta interação. Este processo pode ser simulado computacionalmente, sendo, dentre os métodos existentes, o *docking* molecular um dos mais utilizados. Esta simulação pode ser realizada utilizando-se um algoritmo capaz de prever o modo ideal de ligação de uma molécula pequena (ligante) ao sítio ativo de uma macromolécula alvo. No *docking* molecular, a estrutura do alvo molecular (as coordenadas atômicas da enzima) permanece fixa e diversas posições de encaixe possíveis para o ligante são identificadas computacionalmente. A predição do ligante mais adequado pode ser feita a partir da aplicação de funções escores empíricas, que analisam a interação do complexo (**Shoichet, 2004**). Essa abordagem computacional permite a triagem *in silico* de grandes bibliotecas de compostos, avaliando afinidade e a especificidade a partir de propriedades estruturais e químicas, como tamanho, geometria, distribuição de cargas, polaridade e potencial de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Assim, o objetivo da triagem de bancos de possíveis ligantes é identificar compostos que se ligam mais fortemente a uma proteína alvo em relação ao seu substrato natural. Ao fazer isso, a reação bioquímica que a proteína alvo catalisa pode ser alterada ou impedida (inibição), agindo assim, como potenciais inibidores e conseqüentemente, possíveis fármacos.

Mesmo ainda com algumas limitações computacionais, atualmente o acesso via *internet* a banco de dados de estruturas cristalográficas, como PDB (**Berman et al., 2002**), e de vastas bibliotecas de pequenas moléculas comercialmente acessíveis, como o ZINC *database* (**Irwin & Shoichet, 2005**) fornecem um grande número de possíveis novos inibidores, os quais podem ser comprados ou sintetizados, e então testados *in vitro*, agilizando desta forma a pesquisa farmacêutica (**Shoichet, 2004**).

Esta abordagem é denominada de *Virtual Screening* (VS) e é executada através de *softwares* de simulação de *docking* molecular, como o *Molegro Virtual Dock* (**Thomsen & Christensen, 2006**).

Computação biologicamente inspirada (bio-inspirada) é uma abordagem de desenvolvimento de algoritmos usando modelos biológicos como inspiração para a solução de problemas de otimização, não necessariamente biológicos. Entre os principais exemplos de computação bio-inspirada podemos citar redes neurais (**Wasserman, 1989**) algoritmos genéticos (**Koza et al., 1999**) e algoritmos evolucionários (**Layton, 2008**). Um problema de otimização, que pode ser abordado por tal metodologia, é a simulação computacional da interação proteína-ligante. A simulação da interação proteína-ligante, onde as coordenadas atômicas dos ligantes são obtidas computacionalmente, é chamada de simulação de *docking*. Nesta simulação o ligante pode ser considerado um corpo rígido, sem liberdade de girar os ângulos de torção (*dock* rígido), ou o ligante pode girar seus ângulos de torção durante a simulação (*dock* flexível) (**Dias & De Azevedo, 2008**).

Neste trabalho usamos a implementação de um variante do algoritmo evolucionário implementado no programa MOLDOCK (**Thomsen & Christensen, 2006**). O algoritmo evolucionário é uma técnica de otimização computacional iterativa, inspirada levemente na evolução darwiniana; contudo, no algoritmo evolucionário, a idéia de evolução é simplificada, guardando pouca semelhança com a evolução darwiniana propriamente dita. Na simulação de *docking*, baseada em algoritmos evolucionários, são geradas as posições iniciais do ligante, candidatas à solução (pais), estas posições são geradas aleatoriamente por meio de operadores de variação, como mutação e recombinação. Os indivíduos sendo alterados são os pais e os novos indivíduos gerados são chamados descendentes (ou filhos).

O MOLDOCK usa o algoritmo guiado de evolução diferencial (*Guided Differential Evolution Algorithm*), que emprega uma abordagem alternativa para selecionar e modificar candidatos à solução (indivíduos). A principal inovação desse algoritmo é a idéia de criar descendentes a partir de uma diferença ponderada dos pais.

Na primeira etapa do algoritmo do MOLDOCK todos os indivíduos são inicialmente posicionados aleatoriamente por meio de operadores de variação, como mutação e recombinação, dentro do espaço conformacional delimitado (sítio ativo) e avaliados segundo um critério de ajuste (função *score*). Na próxima etapa, para cada indivíduo da população anterior, um descendente é gerado, adicionando-se uma diferença ponderada das soluções “pais”, que são aleatoriamente selecionados a partir da população. Posteriormente, se o descendente for mais apto (segundo o critério de ajuste), substitui o “pai”, caso contrário o

“pai” continua e passa para próxima geração. Este procedimento é repetido várias vezes, até que o critério de parada seja satisfeito (número máximo de iterações atingido ou se a variância da população está abaixo de um valor de corte, 0,01, por exemplo). O MOLDOCK usa as cavidades previstas na estrutura da proteína para restringir o processo de busca às cavidades proteicas. A aplicação do algoritmo de previsão de cavidades na estrutura da MAO-B, código de acesso: 2XCG (Bonivento *et al.*, 2010) identificou 5 cavidades principais. O algoritmo de evolução diferencial tem mostrado sucesso na previsão da interação proteína-ligante devido ao fato da população inicial, que é aleatoriamente gerada, ser grande, permitindo uma exploração ampla das possibilidades de complexos proteína-ligante. Esta iteração restringe o número de soluções que, em casos favoráveis, leva à solução certa, ou bem próxima da posição cristalográfica. A função escore (energia) usada para avaliar a interação proteína-ligante e como critério de seleção dos indivíduos da população usa a seguinte equação: $\text{Escore} = E_{\text{inter}} + E_{\text{intra}}$, onde E_{inter} leva em conta a energia intermolecular e E_{intra} a energia do ligante (Thomsen & Christensen, 2006). A conformação final docada é selecionada de acordo com seu escore de energia, sendo que a hipótese geral é que os escores mais baixos de energia representam as melhores interações proteína-ligante. Além da função escore intrínseca do programa *MolDock*, outro critério que pode ser utilizado para estimar a afinidade de ligação de um complexo é através do coeficiente de dissociação, ou pK_d , calculado através de uma função polinomial com o programa POLSCORE (De Azevedo & Dias, 2008; Dias *et al.*, 2008).

Em resumo, o *docking* molecular pode ser formulado como um problema de otimização, onde a tarefa é encontrar o modo de fixação do ligando com a menor energia de ligação. Além disso, outros parâmetro podem ser analisados para avaliar a qualidade de um possível fármaco, como as regras de Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001) e ADMETox (Miteva *et al.*, 2006). As regras de Lipinski são baseadas nas propriedades físico-químicas de compostos que passaram na fase 1 de testes clínicos que envolvem determinação de aspectos relacionados à toxicidade e farmacocinética. Os critérios analisam o número de doadores e aceptadores de hidrogênio, a massa molecular e coeficiente de partição ($\log P$) ou lipofilicidade da molécula. Já os critérios de avaliação ADMETox (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) podem ser empregados em pequenas moléculas através de *web server*, como o FAF-*drugs* (Miteva *et al.*, 2006), e possuem além dos parâmetros das regras de Lipinski, outros que avaliam propriedades como área de superfície polar, número de ligações rígidas e flexíveis, número e tamanho de anéis, número de átomos de carbono e não-carbono, carga total, entre outros.

Capítulo 2

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Neste contexto segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente mais de 450 milhões de pessoas são afetadas diretamente por transtornos mentais, a maioria delas nos países em desenvolvimento, com isso, cria-se a necessidade da descoberta de novos agentes terapêuticos para o tratamento da depressão.

Inibidores da Monoamina oxidase (MAO), uma enzima mitocondrial que degrada os neurotransmissores, incluindo a serotonina e a norepinefrina, são comumente utilizados para tratar doenças neurológicas, incluindo a depressão e doença de Parkinson (**Binda *et al.*, 2003**). O presente trabalho buscou identificar novos potenciais inibidores da enzima Monoamina Oxidase (MAO) utilizando ferramentas de bioinformática, através da técnica de *virtual screening*.

Além disso, há três critérios importantes que foram satisfeitos pela nossa proposta: 1) a aplicabilidade dos métodos propostos, 2) a originalidade da nossa abordagem, 3) o potencial de gerar conhecimento novo.

O presente projeto contribuiu na geração de uma grande quantidade de dados estruturais sobre proteínas alvos para o desenho de drogas, bem como sua interação com diferentes ligantes. Tais dados foram de grande utilidade na proposição de novas moléculas que, poderão ser submetidas a testes *in vitro* para a determinação da sua especificidade. Estes, serão disponibilizados na forma de banco de dados estruturais, conforme outros já desenvolvidos pelo coordenador do projeto. Também contribuiu para o desenvolvimento de produtos estratégicos para o ministério da saúde (Linha de ação 9 do Ministério da Ciência e Tecnologia).

Capítulo 3

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Identificar potenciais inibidores para a Monoamina Oxidase B.

3.2 Objetivos específicos:

Este projeto de pesquisa visa identificar novas drogas em potencial usando abordagens *in silico*. O presente projeto de pesquisa realizará a avaliação de diferentes protocolos de simulação computacional de *docking* e *virtual screening*, objetivando identificar os melhores protocolos para simulação de interação proteína-ligante, focados na enzima Monoamina Oxidase. Usaremos computação biologicamente inspirada, especificamente, algoritmos evolucionários, para simular computacionalmente a interação proteína-ligante. A aplicação das metodologias computacionais permitirá a identificação de novas drogas potenciais. Esperamos neste projeto atingir as seguintes metas:

- 1) Simular computacionalmente a interação proteína-ligante por meio de algoritmos de *docking* molecular;
- 2) Identificar aspectos estruturais determinantes para a especificidade do ligante pela proteína;
- 3) Otimizar protocolos de *docking* molecular

Capítulo 4

Materiais e Métodos

- 4.1 *Docking* molecular
 - 4.2 *Re-docking* e *Cross-Docking*
 - 4.3 *Virtual Screening*
 - 4.4 Coeficiente de Spearman
-

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Docking* molecular

Uma metodologia que se mostra eficiente para identificação de novos inibidores é a abordagem computacional de simulação do encaixe de um ligante no sítio ativo de uma enzima. Esta metodologia é chamada de *docking* molecular (De Azevedo *et al.*, 2002).

Esta simulação pode ser realizada utilizando-se um algoritmo capaz de prever o modo ideal de ligação de uma molécula pequena (ligante) ao sítio ativo de uma macromolécula alvo. No *docking* molecular a estrutura do alvo molecular (as coordenadas atômicas da enzima) permanece fixa. Diversas posições possíveis para o ligante são identificadas computacionalmente. Neste processo, normalmente são geradas várias possibilidades de encaixe proteína-ligante. A predição do ligante mais adequado pode ser feita a partir da aplicação da função escore empírica, que analisa a interação do complexo (Shoichet, 2004). Essas abordagens computacionais permitem a triagem *in silico* de bibliotecas de compostos, avaliando afinidade e a especificidade a partir de propriedades estruturais e químicas, como tamanho, geometria, distribuição de cargas, polaridade e potencial de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Assim, o objetivo da triagem de bancos de possíveis ligantes é identificar compostos que se ligam mais fortemente a uma proteína alvo em relação ao seu substrato natural. Ao fazer isso, a reação bioquímica que a proteína alvo catalisa pode ser alterada ou impedida (inibição) (De Azevedo *et al.*, 1997).

Uma função escore é normalmente utilizada para identificar a conformação do ligante mais energeticamente favorável quando ligado ao alvo. A hipótese geral é que os escores mais baixos de energia, podem representar condições mais favoráveis para uma interação proteína-ligante, em comparação com os valores mais altos. Portanto, o *docking* molecular pode ser formulado como um problema de otimização, onde a tarefa é encontrar o ligante e o modo de ligação com os valores mais baixos de energia (De Azevedo *et al.*, 1997).

Para simular a interação da MAO com uma biblioteca de ligantes foi utilizado o programa Molegro Virtual Docker (MVD) (Thomsen & Christensen, 2006), uma implementação de uma variação do algoritmo evolucionário (AE), uma técnica de otimização iterativa inspirada levemente na evolução darwiniana, contudo, neste algoritmo a idéia de evolução é simplificada, guardando pouca semelhança com a evolução darwiniana propriamente dita. Recente avaliação do MVD indica que ele é capaz de encontrar a posição

correta de um ligante. Além disso, MVD, apresenta melhor desempenho global comparado com AUTODOCK, SURFLEX, FLEXX e GOLD (Thomsen & Christensen, 2006; Araújo *et al.*, 2011). No presente trabalho todas as simulações foram realizadas em um Dell (Intel Processador Core 2 Duo, 1.86 GHz, 2GB). MVD traz a implementação de quatro algoritmos de busca para encontrar a posição e orientação do ligante. São eles: MOLDOCK *Optimizer* (implementação do algoritmo de evolução diferencial), MOLDOCK *Simplex Evolution (SE)*, *Iterated Simplex* e *Iterated Simplex* com otimização de colônias de formigas (Thomsen & Christensen, 2006; De Azevedo, 2010a). Neste estudo, antes das simulações de *docking* molecular todos os tipos de átomos e ligações foram corrigidas para ambos os ligantes e a estrutura da monoamina oxidase B usando a função de preparação automática para as simulações (Thomsen & Christensen, 2006). Para cada complexo, os átomos de hidrogênio foram adicionados e as simulações de *docking* molecular foram atribuídas. Esta preparação automática das estruturas foi também aplicada a todos os ligantes utilizados no conjunto de teste para Virtual Screening(VS) (descritas abaixo). Cavidades moleculares foram detectadas usando a ‘esfera de *docking*’ baseada em algoritmo de predição da cavidade. Todas as moléculas de água foram retiradas dos arquivos originais PDB para as simulações de re-*docking* e cross-*docking*.

4.2 Re-docking e Cross-Docking

As simulações de *docking* foram realizadas utilizando o MOLDOCK (Thomsen & Christensen, 2006). Em simulações de *docking* molecular, o melhor complexo binário (proteína-ligante) é a posição mais próxima da estrutura cristalográfica. Por essa razão, devemos estabelecer uma metodologia que avalia a distância da solução gerada por computador (pose) a estrutura cristalográfica. Esta distância pode ser calculada usando o Desvio Médio Quadrático (RMSD), que é uma medida das diferenças entre os valores previstos pelo modelo e os valores efetivamente observados a partir do objeto a ser modelado ou estimado (complexo de proteína-ligante). O RMSD é calculado entre dois conjuntos de coordenadas atômicas, neste caso, um para a estrutura cristalográfica (x_{ctal} , y_{ctal} , z_{ctal} ; o objeto que está sendo modelado) e outra para coordenadas atômicas obtidas das simulações de encaixe (X_{pose} , y_{pose} , z_{pose} ; previsto pelo modelo). A somatória é sobre todos os átomos de N que estão sendo comparados, utilizando a seguinte equação:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{\text{ctal}, i} - x_{\text{pose}, i})^2 + (y_{\text{ctal}, i} - y_{\text{pose}, i})^2 + (z_{\text{ctal}, i} - z_{\text{pose}, i})^2}.$$

Nas simulações de docking espera-se que os melhores resultados gerem um valor de RMSD inferior a 2Å, comparado com a estrutura cristalográfica (Friesner et al., 2004). Este procedimento de obter a estrutura cristalográfica do ligante é frequentemente chamado de “re-docking”, que é fundamentalmente um método de validação que determina se o algoritmo de docking molecular é capaz de recuperar a posição cristalográfica utilizando simulação computacional. Simulações de Re-docking do ligante 2-BFI contra o sitio de ligação imidazolinico na MAO-B foram realizados utilizando as coordenadas atômicas do 2XCG (Bonivento et al., 2010).

Além do *re-docking*, um procedimento chamado "*cross-docking*" também pode ser usado para validar ainda mais um protocolo de *docking*. Considerando que várias estruturas cristalográficas estão disponíveis para a mesma proteína, *cross-docking* pode ser aplicado. Este procedimento envolve uma série de *dockings* de ligantes encontrados em uma variedade de estruturas cristalinas de uma proteína idêntica para uma conformação cristalográfica de uma única proteína rígida (Friesner et al., 2004). Quando um alvo da proteína apresenta grandes mudanças conformacionais sobre ligação do ligante, uma diferença significativa é esperada entre as estruturas cristalográficas e a estrutura “docada”. Nas simulações de *cross-docking* foram utilizados 10 estruturas cristalográficas (códigos de acesso PDB: 1OJ9, 2VRL, 2VZ2, 2XFN, 2XFO, 2XFP, 2XFQ, 2XFU, 3PO7, 2VRM). Este procedimento de validação *re-docking* e *cross-docking* é o estágio inicial do protocolo de Virtual Screening (phase 1) descrito nas próximas etapas.

4.3 Virtual Screening

O *Virtual Screening* (VS) é uma abordagem computacional executada através de *softwares* de simulação de *docking* molecular, como MVD (Thomsen & Christensen, 2006). Nós usamos o protocolo de VS que é dividido em 4 fases, conforme mostrado na (Figura 12). A fase 1 está focada na seleção e validação de um protocolo de *docking*, conforme descrito anteriormente na seção de *re-docking* e *cross-docking*. Esta fase termina quando um protocolo adequado é encontrado (critério de seleção RMSD < 2,0 Å). Deve ser salientado que o critério RMSD é dependente do número de ângulos de torção e um critério menos exigente pode ser

adotado para *re-docking* de um ligante com um número de ângulos de torção superior a 10 (**Thomsen & Christensen, 2006**). Depois que o protocolo de *docking* é escolhido, selecionamos um banco de dados de pequenas moléculas para ser usado no *virtual screening* (fase 2). Além de bases de dados comercialmente orientadas, o banco de dados ZINC também fornece uma interface para a construção de pequenas moléculas com base na similaridade molecular, tais como coeficiente de Tanimoto (**De Azevedo, 2010b; Timmers et al., 2008**). Na fase 3, começamos com simulações de *docking* para cada ligante presente no banco de dados selecionado. O programa MOLDOCK é o “carro-chefe” do presente protocolo. Durante uma simulação de *docking* diversas orientações podem ser obtidas para cada ligante. Aqui nós selecionamos aqueles que tiveram menor função score. A função score utilizada pelo MOLDOCK melhora a precisão de funções scores com uma nova ligação de hidrogênio e novos sistemas de carga. Quatro funções *scores* são implementadas no MOLDOCK, incluindo MOLDOCK *Score* e PLANTS *Score* (**De Azevedo, 2010a; Thomsen & Christensen, 2006**). Estas duas funções oferecem versões baseadas em *grid*, em que a direcionalidade da ligação de hidrogênio não é considerada.

Para melhorar ainda mais a precisão de *docking*, uma função *score*, a *re-rank score*, é introduzida; esta identifica a solução de *docking* mais promissora a partir das soluções obtidas pelo algoritmo de *docking* (**Thomsen & Christensen, 2006**). *Re-rank score* inclui ao *docking* em termos de função *score*, como um termo de torção sp²-sp² e um potencial Lennard-Jones 12-6. A função *re-rank score* é computacionalmente mais cara do que as funções (MOLDOCK e PLANTS *scores*) usadas durante a simulação de *docking*, mas geralmente é melhor do que a função *docking score* na determinação das melhores ‘*poses*’ entre diversas provenientes do mesmo ligante e também para a avaliação da afinidade de ligação ao ligante. Além disso, devido à natureza estocástica do algoritmo de busca, foi aplicado o mesmo protocolo de VS 16 vezes, executando o mesmo em 16 computadores em paralelo, sendo considerado um composto de maior afinidade aquele que estivesse presente na maioria dos resultados de VS.

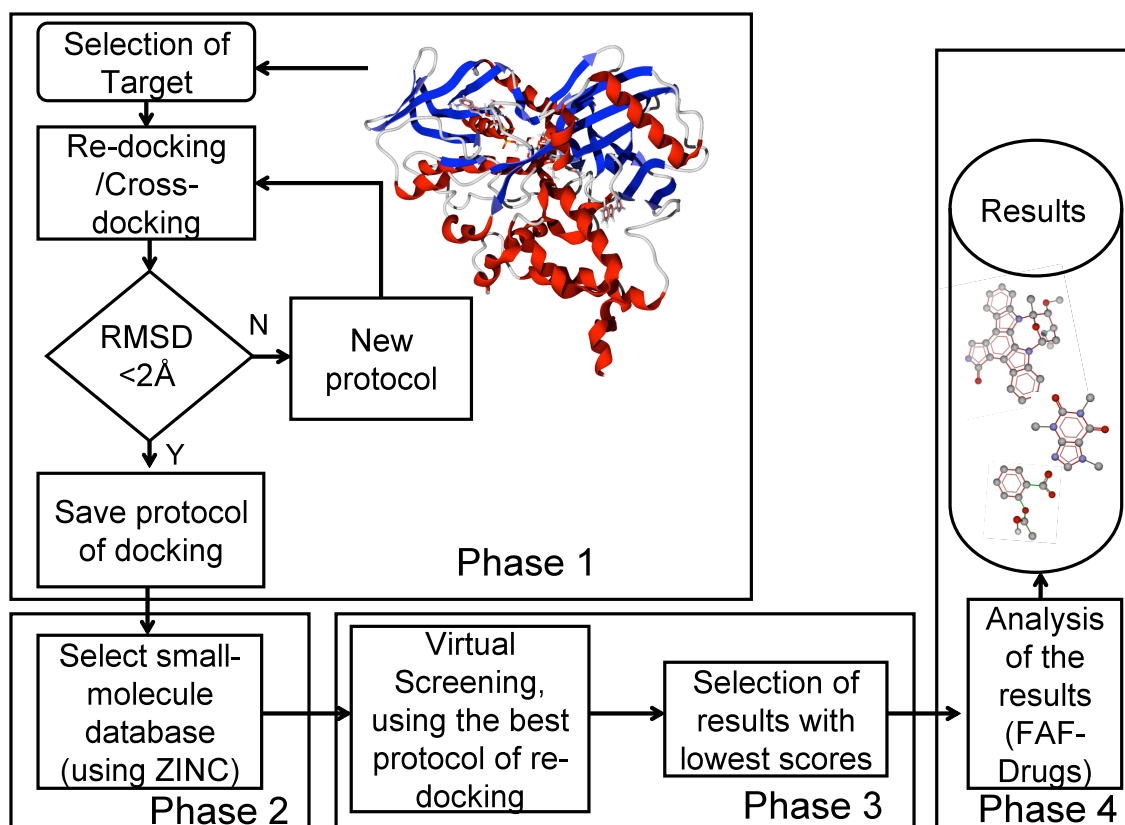
Após a identificação dos potenciais inibidores para simulações de *docking* molecular, os ligantes com melhor *score* foram submetidos ao servidor FAF-Drugs (**Miteva et al., 2006**), a fim de avaliar as propriedades físico-químicas (fase 4). Estas são as propriedades fundamentais que precisam ser consideradas nas fases iniciais do processo de descoberta de drogas e FAF-Drugs permite ao usuário filtrar moléculas através de regras simples, como peso molecular, área de superfície polar, LogP e número de ligações rotáveis. Os ligantes podem ser filtrados após passarem pelas regras de Lipinski dos cinco (RO5). Para passar pela

RO5, as drogas devem apresentar os seguintes critérios de biodisponibilidade oral: peso molecular menor ou igual a 500, LogP menor ou igual a 5, grupos de ligação de hidrogênio doador menor ou igual a 5 e número de grupos de ligação de hidrogênio aceitador menor ou igual a 10 (Eiben & Smith, 2003).

Para confirmar a capacidade do programa MVD, foi avaliado a atividade inibitória de um ligante ligado a MAO-B onde foram selecionados 13 inibidores da MAO-B para os quais dados experimentais para a sua atividade de inibição (IC50) encontrava-se disponível. Esta informação foi retirado do BRENDA (Scheer et al., 2011). A partir de agora este conjunto de estruturas será referida como conjunto de teste.

A fim de identificar novos inibidores comercialmente disponíveis da MAO-B nos focamos nossos esforços de VS na biblioteca SIGMA. Esta biblioteca de pequenas moléculas apresenta 15.186 compostos, todos disponíveis comercialmente para testes *in vitro*. O arquivo que contém as coordenadas tridimensionais atômicas destes compostos, pode ser obtido no formato *.sdf*, através do banco de compostos para *virtual screening*, o ZINC (Irwin & Shoichet, 2005; Shoichet, 2004) também de acesso público (<http://zinc.docking.org>). As coordenadas atômicas para a estrutura 2XCG (Bonivento et al., 2010) foi usado como alvo para VS e estudos de conjunto de teste. As moléculas de água e ligantes foram suprimidos da estrutura. Nós usamos o melhor protocolo de *docking* com a função *re-rank score* identificados na fase 1 para avaliar a afinidade de ligação.

Figura 12 – Fluxograma do *Virtual Screening*.



Fonte: Moraes (2011).

4.4. Coeficiente de Spearman

Afim de validar ainda mais o protocolo de VS foi calculado o Coeficiente de Spearman (ρ), que leva em conta a relação entre atividade e energia de interação. O Coeficiente de spearman pode ser definido pelaseguinte equação:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{j=1}^N [r(x_j) - r(y_j)]^2}{N^3 - N}$$

Onde n é o número de pares ($n=13$ no nosso caso), $r(x_i)$ e $r(y_i)$ são a classificação do pIC_{50} e do re-rank score da amostra J no conjunto de dados. O coeficiente ρ de Spearman varia entre -1 e 1. Quanto mais próximo estiver destes extremos, maior será a associação entre as variáveis. O sinal negativo da correlação significa que as variáveis variam em sentido

contrário, isto é, as categorias mais elevadas de uma variável estão associadas a categorias mais baixas da outra variável (**Otyepka *et al.*, 2000**).

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5.1 *Re-docking e Cross-docking*

5.2 *Virtual Screening*

5.3 Coeficiente de Spearman

5.4 Interações moleculares

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Re-docking e Cross-docking*

Um dos resultados mais importantes derivados da várias aplicações do programa MVD é a comparação de simulações de *re-docking* entre os programas de *docking*, MVD e outros, como o GOLD, FLEXX, GLIDE e AUTODOCK (Thomsen & Christensen, 2006; Araújo *et al.*, 2011). Estas comparações indicam fortemente que o MVD é capaz de obter menores RMSDs na grande maioria das estruturas cristalográficas analisadas (simulações de *re-docking*). Além disso, MVD não só apresenta um melhor desempenho global nas simulações de *re-docking* como também é mais rápido do que AUTODOCK (Araújo *et al.*, 2011), um dos primeiros programas de simulação de *docking* molecular. Estes resultados demonstram que MVD é confiável e, portanto, ele foi usado no presente trabalho.

Inicialmente, uma busca para o melhor protocolo de *docking* molecular foi realizada. A estrutura do 2-BFI no complexo MAO-B:tranilcipromina, foi usado para simulações de *re-docking*. O critério fundamental que descreve a qualidade de uma simulação de *docking* molecular é o RMSD. Em aplicações de *docking* molecular, o complexo binário melhor é a aproximação à estrutura determinada por cristalografia de raio-X. Análise dos resultados de *re-docking* para a combinação de quatro algoritmos de busca e quatro funções *scores* (um total de 16 protocolos diferentes de *docking*) geraram um RMSD variando de 0,2-12,08 Å. A tabela 1 mostra o RMSD para todos os 16 protocolos de *docking*. Os melhores resultados foram obtidos para os algoritmos de busca a seguir: MOLDOCK *SE*, MOLDOCK *Optimizer*, e *Iterated Simplex*. *Iterated simplex* com a otimização de colônias de formigas gerou o pior RMSD (12,08 Å). Os parâmetros para o *docking*, especialmente as características do algoritmo de busca, foram otimizados executando várias simulações de *docking* molecular no complexo da estrutura. Os seguintes parâmetros e suas combinações foram variados: raio da esfera *docking*, número de séries, número máximo de interações e tamanho da população máxima. Os parâmetros otimizados para o *docking* são os seguintes:

Preparation (arquivo de entrada proteína/ligantes)

Assign all below: always

Assign bonds: always

Assign bonds orders and hybridization: always

Create explicit hydrogens: always

Assign charges (calculated by MVD): always

Detect flexible torsions in ligands: always

Assign Tripos atom types: always

Scoring function

Score: Re-rank Score

Grid resolution (Å): 0.30

Binding site

Origin – Center:

X: 50.63 Y: 161.17 Z: 31.34 Radius: 10

Search algorithm

Algorithm: MolDock SE

Number of runs: 10

Constrain poses to cavity

After docking: Optimize H-Bonds

Parameter settings

Population size: 50

Max iterations: 1500

Pose generation

Energy threshold: 100.00

Tries: Min: 10 Quick: 10 Max: 30

Simplex evolution

Max steps: 300

Neighbour distance factor: 1.00

Poses Clustering

Return multiple poses for each run

Max number of poses returned: 5

Cluster similar poses. RMSD threshold: 1.00

Ignore similar poses (for multiple runs only). RMSD threshold: 1.00

A figura 13 mostra a esfera de *docking* utilizada nas simulações de *re-docking*. A combinação do MOLDOCK *SE* e *re-rank score* gerou um RMSD muito baixo (0,2 Å), por este motivo, escolhemos este protocolo de *docking*, que é usado em todas as outras simulações de *docking* molecular. Simulações de *cross-docking* foram feitas para 10

complexos da MAO-B, usando este protocolo; gerando um RMSD que varia entre 1,45-1,80Å, validando ainda mais o presente protocolo.

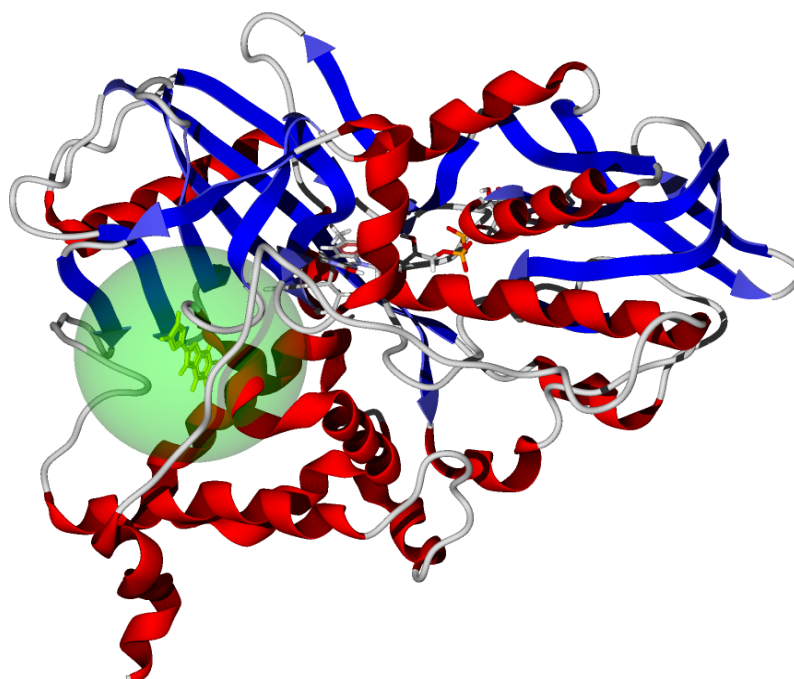
Tabela 1: RMSD para todos os 16 protocolos de *docking*.

Protocolo	Scoring functions	Search algorithm	RMSD (Å)	RMSD (Å)	RMSD (Å)	RMSD (Å)
Sorting criteria			MolDock Score	Rerank Score	HBond	RMSD
1	MolDock Score	MolDock Optimizer	1,61	0,20	1,61	0,20
2	MolDock Score	MolDock (Simplex Evolution) SE	1,61	0,20	1,61	0,20
3	MolDock Score	Iterated Simplex	1,61	0,20	1,61	0,20
4	MolDock Score	Iterated Simplex (Ant Colony Optimization)	1,61	0,20	1,61	0,20
5	MolDock Score [GRID]	MolDock Optimizer	1,56	1,56	1,56	0,27
6	MolDock Score [GRID]	MolDock (Simplex Evolution) SE	12,08	12,08	12,08	11,54
7	MolDock Score [GRID]	Iterated Simplex	1,56	1,56	1,56	0,28
8	MolDock Score [GRID]	Iterated Simplex (Ant Colony Optimization)	1,56	1,56	1,56	0,27
Protocol	Scoring functions	Search algorithm	RMSD (Å)	RMSD (Å)	RMSD (Å)	RMSD (Å)
Sorting criteria			Plants Score	MolDock Score	Rerank Score	RMSD
9	PLANTS Score	MolDock Optimizer	1,60	1,60	0,23	0,23
10	PLANTS Score	MolDock (Simplex Evolution) SE	1,60	1,60	0,23	0,23
11	PLANTS Score	Iterated Simplex	1,60	1,60	0,23	0,23

12	PLANTS Score	Iterated Simplex (Ant Colony Optimization)	1,60	1,60	0,23	0,23
13	PLANTS Score [GRID]	MolDock Optimizer	1,54	1,54	0,21	0,21
14	PLANTS Score [GRID]	MolDock (Simplex Evolution) SE	1,54	1,54	0,21	0,21
15	PLANTS Score [GRID]	Iterated Simplex	1,54	1,54	0,21	0,21
16	PLANTS Score [GRID]	Iterated Simplex (Ant Colony Optimization)	1,54	1,54	0,21	0,21

Fonte: De Azevedo (2011).

Figura 13 – Esfera de *docking* utilizada nas simulações de *re-docking*



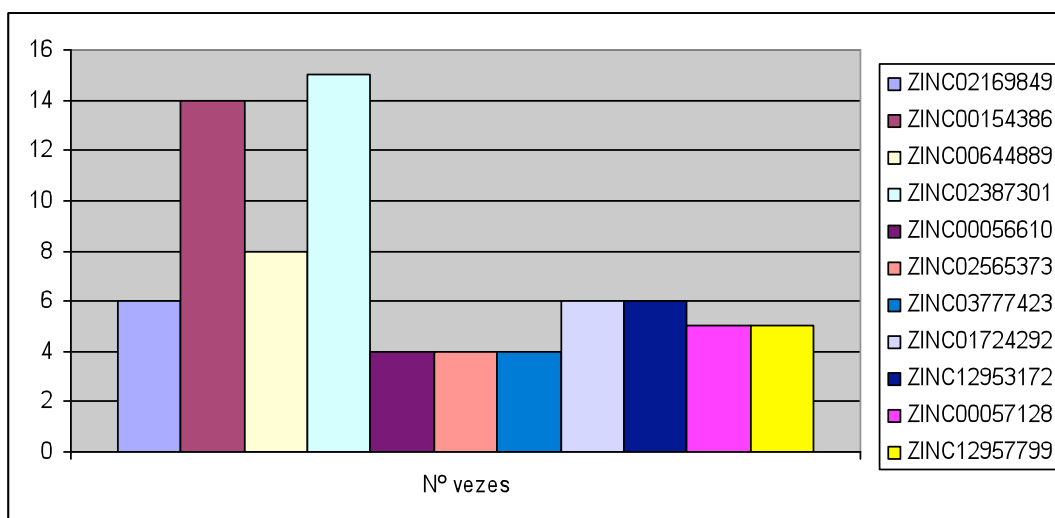
Fonte: Moraes (2011).

5.2 *Virtual Screening*

Virtual Screening é uma abordagem computacional usada para identificar novos potenciais inibidores para uma proteína alvo para o qual a estrutura 3D está disponível. Tem sido aplicado com sucesso para identificar uma infinidade de inibidores (**Heberlé *et al.*, 2011; De Azevedo, 2010a, De Azevedo, 2010b**). Permite a triagem *in silico* de vastas bibliotecas de pequenas moléculas para a seleção de potenciais inibidores de enzimas alvo e conseqüentemente, possíveis fármacos (**Silveira *et al.*, 2005; da Silveira *et al.*, 2006**). Duas metodologias principais são usadas no VS. Métodos que buscam semelhanças com ligantes validados e métodos de docking molecular que requerem o uso de informação cristalográfica do alvo. Aqui nosso foco é sobre a identificação de novos potenciais inibidores de MAO-B. Embora estudos anteriores de VS tenham sido realizados sobre a MAO-B (**Gaspar *et al.*, 2011; Shelke *et al.*, 2011**), não há estudos utilizando a combinação do algoritmo de busca MOLDOCK SE e MOLDOCK score. Além disso, este é o primeiro estudo de VS focado no sítio de ligação imidazolínico sobre MAO-B.

Aplicação do protocolo de docking descrito anteriormente para um banco de dados com 15.186 compostos retornou como os melhores resultados 11 compostos, com re-rank score abaixo de -100. Entre estes 11 compostos, 2 destacaram-se, uma vez que foram encontrados entre os melhores. São eles: ZINC00154386, denominado pela IUPAC como 3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-piperidin-1-ium-4-yl-1,2,4-oxadiazole estava presente em 14 computadores e ZINC02387301, denominado pela IUPAC como 5-[5-(5-formylthiophen-2-yl)thiophen-2-yl]thiophene-2 carbaldehyde), estava presente em 15 computadores (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Avaliação do *Virtual screening* comparando os ligantes e suas frequências



Fonte: Moraes (2011).

Estes 11 potenciais inibidores foram submetidos a testes de filtro, disponível no servidor FAF-Drugs (Miteva *et al.*, 2006), para excluir aqueles que teriam indesejáveis características físico-químicas como a biodisponibilidade oral.

Os parâmetros FAF-Drugs (Miteva *et al.*, 2006), utilizados foram baseados nas regras de Lipinski's. A partir do conjunto dos 11 ligantes selecionados, 8 passaram nas regras, incluindo o ZINC00154386 e o ZINC02387301. A figura 14 mostra as estruturas moleculares para os 8 ligantes. Os ligantes selecionados são apresentados na (Tabela 2). O *re-rank Score* para essas 8 moléculas vão desde -116.958 a -100.029.

Figura 14 – Estrutura molecular do ZINC02387301(a), ZINC00154386(b), ZINC02169849(c), ZINC00644889(d), ZINC00056610(e), ZINC02565373(f), ZINC01724292(g), ZINC00057128(h).

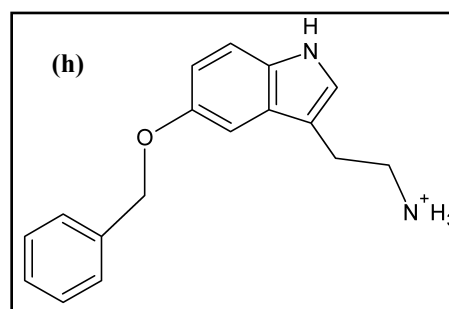
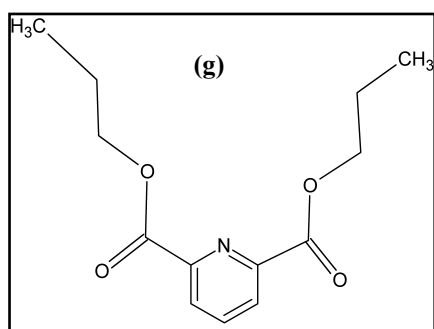
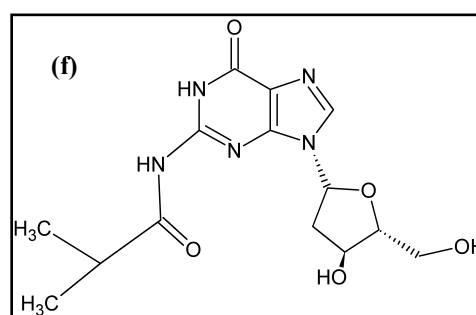
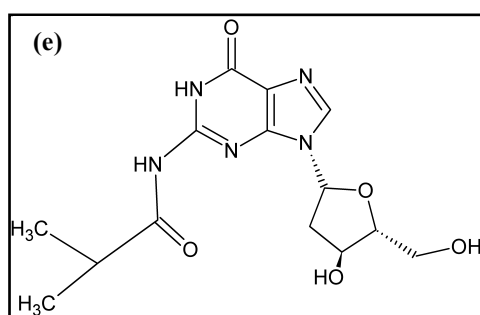
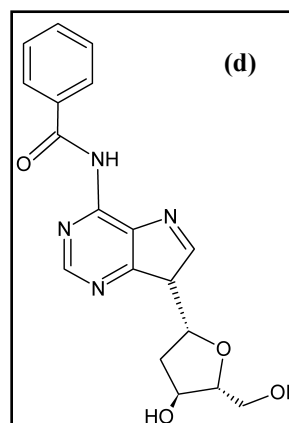
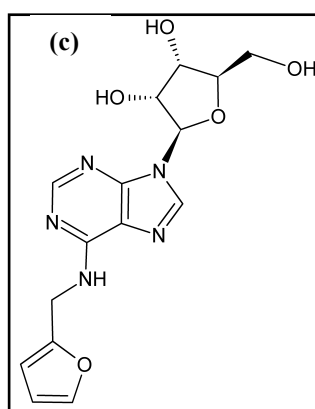
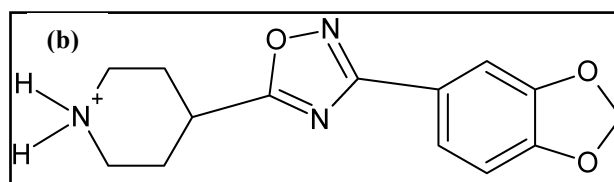
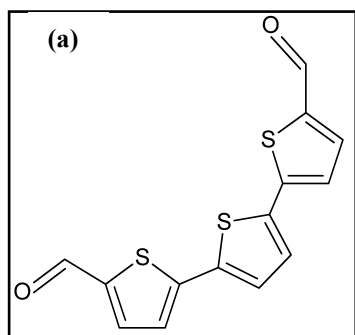


Tabela 2 – Propriedades físico-químicas dos ligantes que passaram pela Regra de Lipinski após a análise por FAFDrugs.

Ligante	Código	Peso Molecular (Da)	Número de hidrogênios aceitadores	Número de hidrogênios doadores	XLogP
1	2387301	304,4	2	0	4
2	154386	274,2	3	1	1,8
3	2169849	347,3	5	4	0,2
4	644889	355,3	4	3	0,2
5	56610	337,3	5	4	-0,1
6	2565373	292,3	4	1	3,2
7	1724292	279,3	5	0	3,7
8	57128	267,3	1	2	2

Fonte: Moraes (2011).

5.3 Coeficiente de Spearman

O VS foi validado comparando os valores de IC50 para vários derivados da MAO testados com interação de energia para o *docking* experimental (Tabela 3), onde obtivemos um coeficiente de Spearman de 0,80 ($\rho = 0,80$), que seria o mesmo que o valor crítico a nível de significância de 0,002. Com isso, pode-se dizer que os experimentos de docking rígido podem ser usados para prever a atividade qualitativa. Publicações anteriores para docking molecular de quinases exibiu um coeficiente de spearman de 0,643 (Otyepka *et al.*, 2000); indicando, com isso, que o protocolo de VS atual é adequado para o nosso propósito.

Além disso, a aplicação do protocolo de melhor *docking* para simular a interação do 2-BFI com a estrutura do Ile199Ala mutante de MAO-B humana (código de acesso PDB: 2XFO) gerou um *re-rank score* de -72,06, superior à *re-rank* para 2-BFI no complexo com tranilcipromina:MAO-B (-86,57). Um estudo publicado anteriormente (Bonivento *et al.*, 2010), indicou que o 2-BFI se liga à enzima mutante fracamente com um Ki de aproximadamente 58 μM , enquanto que 2-BFI liga a tranilcipromina de MAO-B humana com

um valor de Kd de 9 nM, que é um aumento de quase mil vezes na afinidade de ligação para 2-BFI na inibição tranilcipromina especificamente observada em MAO-B humanas. Estes resultados experimentais estão de acordo com *re-rank score* estimada com MVD. Em conjunto, estes resultados indicam que este protocolo de docking também pode ser aplicado para avaliar a afinidade de ligação de compostos identificados em um estudo VS.

Tabela 3 – Comparação de valores de IC50 de vários derivados da MAO testados com energia de interação para *docking* experimental.

Ligante	Moldock	Rerank	H Bond	IC50	Log(IC50)
	Score	Score			
Clorgyline	-106,717	-85,5701	-1,6474	0,00042	-6,3767
cis-2,4,5-trimethoxypropenylbenzene	-84,506	-50,7948	0	0,362	-3,4412
Eugenol Methyl Ether	-78,6633	-66,0726	0	0,269	-3,57024
Deprenyl	-69,503	-23,0131	0	0,0023	-5,6382
Isatin	-60,6128	-51,2535	-2,5	0,008566	-5,0672
Eugenol	-58,33	-11,279	-2.499	0,288	-3,5406
(1S,2S)-(+)-psi-ephedrine	-56,2415	-28,2115	3,42698	234	-0,6307
O-eugenol	-53,8414	-19,5025	-0,9745	0,5	-3,301
4-Hydroxy-3-methoxybenzylamine	-53,6122	729.994	2,49674	0,382	-3,4179
(1R,2R)-(+)-psi-ephedrine	-50,0494	12,047	-2,5	88	-1,0555
2-(aminooxy)-1-phenylethanol	-48,1304	-14,2979	-1,9337	0,25	-3,602
2,6-dimethoxyphenol	-46,6543	-9,57545	-0,6459	0,5	-3,301
2-methoxyphenol	-45,5002	-37,1172	-6,0724	0,5	-3,301

Fonte: Moraes (2011).

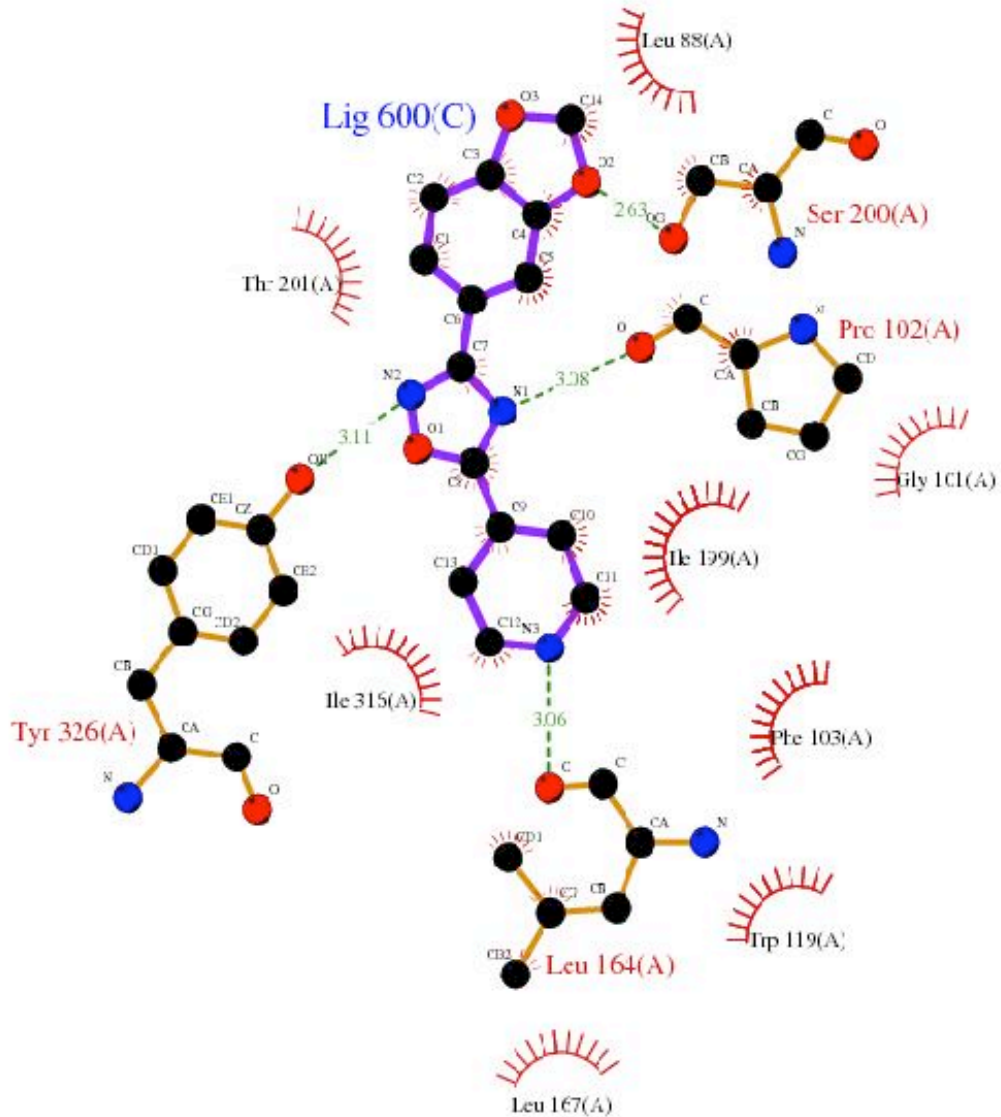
5.4 Interações moleculares

A fim de melhor compreender as interações destas 8 moléculas com a MAO-B, usamos o programa LIGPLOT (**Wallace *et al.*, 1995**) para acessar os átomos de ambos, pequenas moléculas e as proteínas que são responsáveis para fazer ligações de hidrogênio e contatos de Van de Waals. Na figura 15 está demonstrado o ligplot para o ZINC0015386 e na figura 16 o ligplot do ZINC02387301.

Análise da interação intermolecular indica ‘resíduos chaves’ responsáveis pela especificidade de ligação ligante. Ligação do 2 - (2-benzofuranyl)-2-imidazoline a MAO-B é mostrada na figura 17. Ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo resíduos Tyr326 e Pro102. Contatos de Van der Waals estão presentes entre o ligante e os resíduos Phe 168, Leu 164, Il 316, Il 199, Leu 171, e Leu 88.

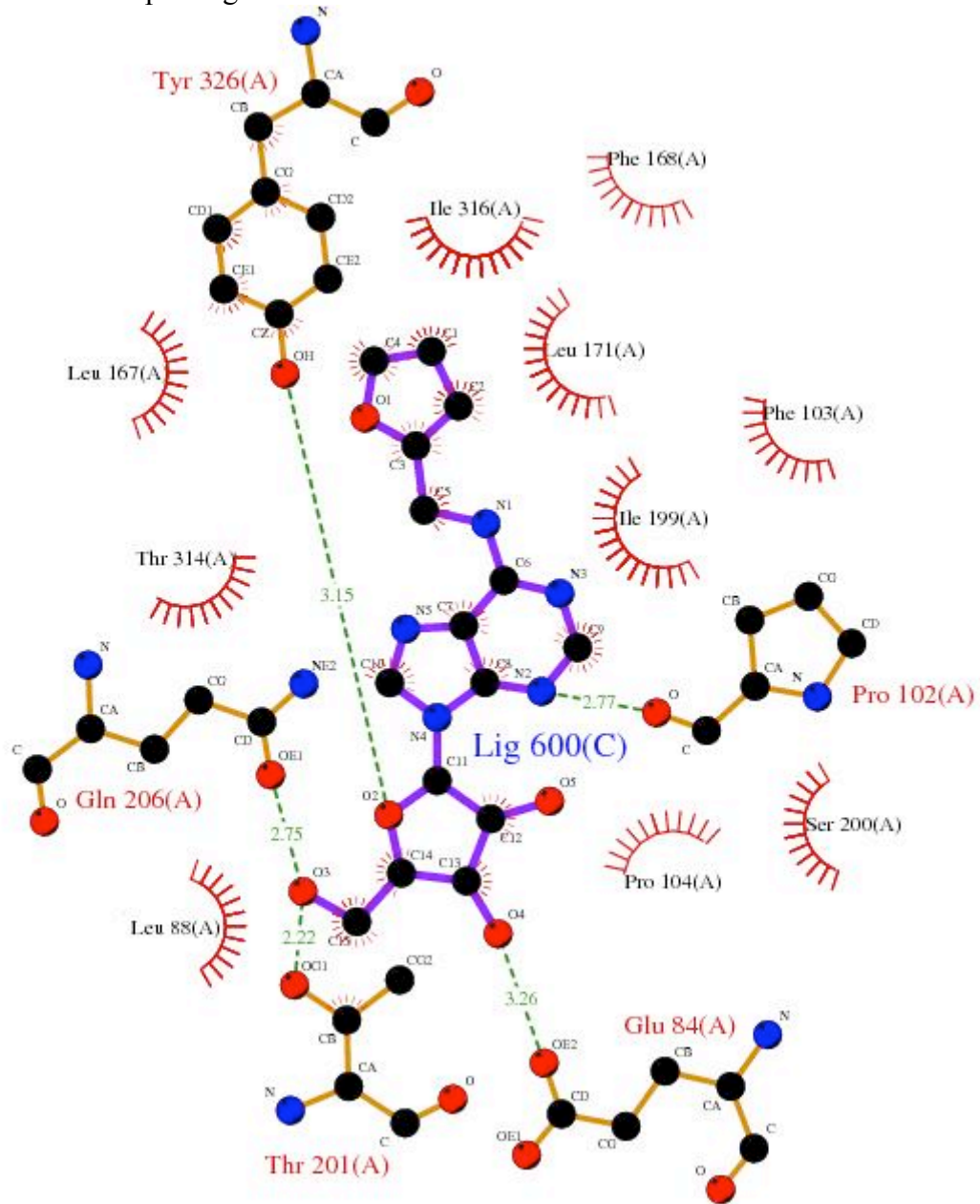
Informações sobre as interações moleculares para os 8 compostos estão na tabela 4. Análise da ligação do 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline na cavidade, indicou que todos os 8 compostos apresentam interações com os resíduos: Ile316, Ile199 e Leu88. Dos 8 compostos 6 apresentaram interações com os resíduos: Leu171, Leu167, Leu171. O resíduo Tyr326 é encontrado nas interações com os ligantes 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, que indica fortemente a importância desses resíduos para a especificidade do ligante, como tem sido sugerido a partir da análise da estrutura cristalográfica do 2-BFI em complexo com tranilcipromina:MAO-B (**Bonivento *et al.*, 2010**).

Figura 15- Ligplot do ZINC00154386 demonstrando as ligações de hidrogênio e os contatos hidrofóbicos feitos pelo ligante 2BFI com a enzima MAO-B.



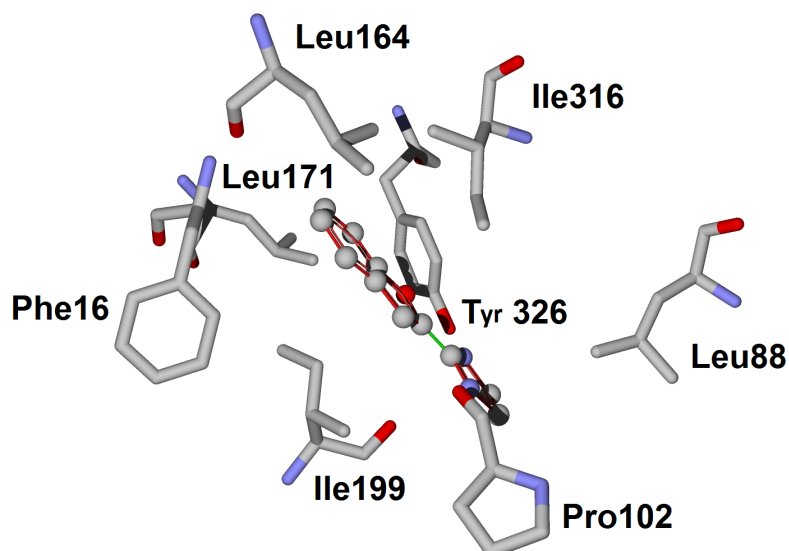
Representação: átomos de oxigênio (esferas vermelhas); átomos de carbono (esferas pretas); átomos de nitrogênio (esferas azuis); ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde); ligações entre os átomos do ligante (linhas em lilás); ligações entre os átomos do FMN (linhas em caramelo); contato hidrofóbicos (semi-círculos em vermelho). Fonte: Moraes (2011).

Figura 16 – Ligplot do ZINC02387301 demonstrando as ligações de hidrogênio e os contatos hidrofóbicos feitos pelo ligante 2BFI com a enzima MAO-B.



Fonte: Moraes (2011).

Figura 17 – Ligação do 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline com resíduos principais encontrados em interações intermoleculares com o 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline.



Fonte: Moraes (2011).

Tabela 4 – Interações intermoleculares para os ligantes selecionados com melhor score no processo de VS. A presença de um X indica que a interação ocorre. HB significa pontes de hidrogênio e VDW significa contatos de Van der Waals.

Resíduos	Ligantes				
	HB	ZINC02387301	ZINC00154386	ZINC02169849	ZINC00644889
Ser200		X	X		X
Tyr326		X	X	X	
Ala325		X			
Pro102			X		
Thr201				X	
Glu84				X	X
Gln206				X	
Gly101					
Leu164					
VDW					
Pro102		X			X

Phe168	X		X	X
Ile316	X	X	X	X
Ile199	X	X	X	X
Leu167	X	X	X	X
Leu171	X		X	X
Leu88	X	X	X	X
Gly101		X		X
Phe103		X	X	
Trp119		X		
Thr201		X		
Ser200			X	
Pro104			X	
Thr314			X	X
Tyr326				X
Leu164				
Glu84				
Ala325				
Leu345				
Thr202				

Resíduos	Ligantes				
	HB	ZINC00056610	ZINC02565373	ZINC01724292	ZINC00057128
Ser200	X				
Tyr326				X	
Ala325					X
Pro102					
Thr201	X		X		
Glu84	X				
Gln206					
Gly101	X				
Leu164					X
VDW					
Pro102			X	X	X

Phe168		X		X
Ile316	X	X	X	X
Ile199	X	X	X	X
Leu167			X	X
Leu171		X	X	X
Leu88	X	X	X	X
Gly101		X	X	
Phe103	X	X	X	X
Trp119				
Thr201				X
Ser200		X	X	X
Pro104	X		X	
Thr314				
Tyr326	X			
Leu164	X	X		
Glu84		X		X
Ala325			X	
Leu345			X	
Thr202		X		

Fonte: Moraes (2011).

Capítulo 6

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A pesquisa e o desenvolvimento de compostos mais efetivos contra a doença de Parkinson representa uma necessidade à saúde pública mundial. Inibidores da monoamina oxidase, uma enzima que catalisa a desaminação oxidativa de aminas biogênicas, como monoaminas neurotransmissoras (serotonina, norepinefrina, dopamina) e neuromoduladoras (β -feniletilamina), assim como monoaminas bioativas exógenas (tiramina); são considerados alvos promissores para o desenvolvimento de drogas contra parkinson. Alguns estudos têm demonstrado que derivados imidazolínicos são capazes de inibir a atividade da MAO. Os sítios imidazolínicos I_2 são encontrados na membrana mitocondrial externa e possuem como característica importante a sua alta afinidade para uma série de compostos imidazolínicos e guanidínicos. Além disso, os sítios I_2 têm sido subdivididos conforme sua capacidade de reconhecer o composto guanidínico, amilorida. Sítios sensíveis à amilorida são designados I_{2A} , e provavelmente estejam localizados na MAO-A. Os sítios I_{2B} são insensíveis à amilorida estando presentes na MAO-B. Porém, ainda não se sabe o mecanismo de interação entre os sítios I_2 e as isoformas da MAO. Acredita-se que este sítio seja distinto do sítio catalítico da enzima, e independente do grupo prostético FAD, ou dos domínios de ligação a inibidores clássicos da MAO. De fato, estudos demonstram que a maioria dos resíduos de aminoácidos (149-222) identificados como sítios I_2 na MAO-B são encontrados na cavidade de entrada do sítio catalítico da enzima. Neste estudo nós focamos na MAO-B.

Com o avanço dos estudos de algoritmos de *docking* molecular, disponíveis hoje em dia, torna-se possível realizar maiores estudos de *Virtual Screening* focados em bibliotecas de pequenas moléculas com milhões de compostos. O estudo da computação biologicamente inspirada aplicada ao estudo da interação da monoamina oxidase e inibidores demonstrou que o protocolo de *docking* molecular foi capaz de recuperar a posição cristalográfica de um ligante presente no sítio ativo da MAO-B. Nós utilizamos o algoritmo de busca *simplex evolution* para realizar pesquisa de *docking* flexível para a predição das atividades inibitórias da MAO-B. Os parâmetros para o *docking* flexível foram otimizados, para permitir-nos o trabalho de rotina. Depois disso, simulações de *cross-docking* foram realizadas com o sítio de ligação imidazolínico. Calculamos a correlação entre o escore de classificação MOLDOCK do programa MVD e a atividade inibitória respectiva da MAO-B. Os coeficientes de correlação calculados mostram que o *docking* usando a combinação do algoritmo *simplex evolution* e MOLDOCK score é uma técnica adequada para fazer previsões qualitativas sobre a atividade. Ao mesmo tempo, os resultados confirmam a suposição de que existe uma relação

considerável entre o IC_{50} e re-rank score. Estudamos também a influência de ‘resíduos chaves’ na interação ligante com MAO-B e tentamos prever novos compostos possivelmente ativos. Nós identificamos dois compostos (ZINC00154386 e ZINC02387301) com MOLDOCK score baixo. Ambos os compostos apresentam interações que envolvem resíduos Tyr326 e Pro102, como observado para a estrutura cristalográfica 2XCG. As informações obtidas neste estudo serão utilizadas para a concepção de novos inibidores da MAO-B e para o trabalho adicional na área de simulações de docking molecular.

Referências

REFERÊNCIAS

Adell A, Biggs TA, Myers RD. Action of harmaline (1-methyl- β -carboline) on the brain: body temperature and in vivo efflux of 5-HT from hippocampus of the rat. *Neuropharmacology* 1996; 35(8):1101-1107.

Airaksinen MM & Kari I. β -carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: occurrence, origin and metabolism. *Med Biol.* 1981; 59(1):21- 34.

Alemanly R, Olmos G, García-Sevilla JA. The effects of phenelzine and other monoamine oxidase inhibitors antidepressants on brain and liver I₂ imidazoline-preferring receptors. *Brit. J Pharmacol.* 1995a; 114(4):837-845.

Alemanly R, Olmos G, Escribá PV, Menargues A, Obach R, García-Sevilla JA. LSL60101, a selective ligand for I₂ receptors, on glial fibrillary acidic protein concentration. *Eur J Pharmacol.* 1995b; 280(2):205-210.

Anderson MC, Hasan F, McCrodden JM, Tipton KF. Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochem. Res.* 1993; 18(11):1145-1149.

Andrés AM, Soldevila M, Navarro A, Kidd KK, Oliva B, Bertranpetit J. Positive selection in MAO-A gene is human exclusive: determination of the putative amino acid change selected in the human lineage. *Hum Genet.* 2004; 115(5):377-386.

Araújo JQ, Lima JA, Pinto Ada C, de Alencastro RB, Albuquerque MG (2011) Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Model.* 2011; 17(6):1401-12.

Atlas D. Clonidine-displacing substance (CDS) and its putative imidazoline receptor. New leads for further divergence of alpha 2-adrenergic receptor activity. *Biochem Pharmacol.* 1991; 41(11):1541-49.

Bach AW, Lan NC, Johnston DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan SW, Seeburg PH, Shih JC. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(13):4934-38.

Bennett DA, Beckett LA, Murray AM, Shannon KM, Goetz CG, Pilgrim DM, Evans DA. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med.* 1996; 334(2):71-6.

Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, Feng Z, Gilliland GL, Iype L, Jain S, Fagan P, Marvin J, Padilla D, Ravichandran V, Schneider B, Thanki N, Weissig H, Westbrook JD, Zardecki C. The protein data bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2002; 58(Pt 6 No 1):899-907.

Bidet M, Poujeol P, Parini A. Effect of imidazolines on Na⁺ transport and intracellular pH in renal proximal tubule cells. *Biochem Biophys Acta.* 1990; 1024(1):173-8.

Binda C, Newton-Vinson P, Hubálek F, Edmondson DE, Mattevi A. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat Struct Biol.* 2002; 9(1):22-6.

Binda C, Li M, Hubálek F, Restelli N, Edmondson DE, Mattevi A. Insight into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(17):9750-5.

Bonivento D, Milczek EM, McDonald GR, Binda C, Holt A, Edmondson DE, Mattevi A. Potentiation of ligand binding through cooperative effects in monoamine oxidase B. *J Biol Chem.* 2010; 285(47):36849-56.

Boronat MA, Olmos G, García-Sevilla JA. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease on neurofilament protein by idazoxan and other I₂-imidazoline ligands. *Brit J Pharmacol.* 1998; 125(1):175-85.

Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effects of alpha-adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984; 230(1):232-36.

Bousquet P. I₁ receptors, cardiovascular function, and metabolism. *Am J Hypertens.* 2001; 14 (11 Pt 2):317S-321S.

Boyajian CL, Loughlin SE, Leslie FM. Anatomical evidence for the alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of [3H]rauwolscine and [3H]idazoxan in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987; 241(3):1079-91.

Bricca G, Dontenwill M, Molines A, Feldman J, Belcourt A, Bousquet P. The imidazoline preferring receptor: binding studies in bovine, rat and human brainstem. *Eur J Pharmacol.* 1989; 162(1):1-9.

Bricca G, Grenay H, Dontenwill-Kieffer M, Zhang J, Belcourt A, Bousquet P. Heterogeneity of the specific imidazoline binding of [3H]idazoxan in the human cerebral cortex. *Neurochem Int.* 1993; 22(2):153-63.

Campbell, M. K., *Bioquímica*. 3^a ed.; ArtMed Editora: Porto Alegre, 2000.

Canduri F, De Azevedo WF Jr. Structural basis for interaction of inhibitors with Cyclin-Dependent Kinase 2. *Curr Computer-Aided Drug Design* 2005; 1(1):53-64.

Cantiello HF, Lanier SM. α 2-adrenergic receptors and the Na⁺/H⁺ exchanger in the intestinal epithelial cell line, HT-29. *J. Biol. Chem.* 1989; 264(27):16000-7.

Cappendijk SL, Fekkes D, Dzoljic MR. The inhibitory effect of norharmane on morphine withdrawal syndrome in rats: comparison with ibogaine. *Behav Brain Res.* 1994; 65(1):117-9.

Carpené C, Collon P, Remaury A, Cordi A, Hudson A, Nutt D, Lafontan M. Inhibition of amine oxidase activity by derivatives that recognize imidazoline I₂ sites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 272(2):681-8.

Cesura AM, Pletscher A. The new generation of monoamine oxidase inhibitors. *Prog Drug Res.* 1992; 38:171-257.

Cesura AM, Gottowik J, Lahm HW, Lang G, Imhof R, Malherbe P, Röthlisberger U, Da Prada M. Investigation on the structure of the active site of monoamine oxidase B by affinity labeling with selective inhibitor lazabemide and by site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem.* 1996; 236(3):996-1002.

Chan SL, Dunne MJ, Stillings MR, Morgan NG. The alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K⁺ATP channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol.* 1991; 204(1):41-8.

Chan SL, Brown CA, Scarpello KE, Morgan NG. Pancreatic beta-cells express an imidazoline binding site that is distinct from I₁ and I₂ sites. *Ann NY Acad Sci.* 1995; 763:153-6.

Chen JJ, Swope DM. Clinical pharmacology of rasagiline: a novel, second-generation propargylamine for the treatment of Parkinson disease. *J Clin Pharmacol.* 2005; 45(8):878-94.

Coupry I, Atlas D, Podevin RA, Uzielli I, Parini A. Imidazoline-guanidinium receptive site in renal proximal tubule: asymmetric distribution, regulation by cation and interaction with an endogenous clonidine displacing substance. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 252(1):293-9.

Crane GE. The psychiatric effects of iproniazid. *Am J Psychiatry.* 1956; 122:494-501.

Da Prada M, Zürcher G, Würthrich I, Haefely WE. On tyramine, food, beverages and the reversible MAO inhibitors moclobemide. *J Neural Transm Suppl.* 1988; 26:31-56.

Da Silveira NJ, Bonalumi CE, Uchōa HB, Pereira JH, Canduri F, de Azevedo WF. DBMODELING: a database applied to the study of protein targets from genome projects. *Cell Biochem Biophys.* 2006; 44(3):366-74.

De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem.* 1997; 243(1-2):518-526.

De Azevedo WF Jr, Canduri F, da Silveira NJ. Structural basis for inhibition of cyclin-dependent kinase 9 by flavopiridol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 293(1):566-71.

De Azevedo WF Jr, Dias R. Evaluation of ligand-binding affinity using polynomial empirical scoring functions. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16(20):9378-82.

De Azevedo WF Jr. MolDock Applied to Structure-Based Virtual Screening. *Curr Drug Targets.* 2010a; 11(3): 327-34.

- De Azevedo WF Jr. Structure-based virtual screening. *Curr Drug Targets*. 2010b; 11(3):261–3.
- De Colibus L, Li M, Binda C, Edmondson DE, Mattevi A. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(36):12684-9.
- De Vos H, Bricca G, De Keyser J, De Backer JP, Bousquet P, Vauquelin G. Imidazoline receptors, non-adrenergic idazoxan binding sites and alpha 2-adrenoceptors in the human central nervous system. *Neuroscience*. 1994; 59(3):589-98.
- De Zutter, GS, Davis RJ. Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(11):6168-73.
- Diamant S, Eldar-Geva T, Atlas D. Imidazoline binding sites in human placenta: evidence for heterogeneity and a search for physiological function. *Brit J Pharmacol*. 1992; 106(1):101-8.
- Dias, R.; De Azevedo Jr., W.F. Molecular docking algorithms. *Curr Drug Targets*. 2008; 9(12):1040-7.
- Dias R, Timmers LFSM, Caceres RA, De Azevedo WF Jr. Evaluation of molecular docking using polynomial empirical scoring functions. *Curr Drug Targets*. 2008; 9(12):1062-70.
- Dodel RC, Eggert KM, Singer MS, Eichhorn TE, Pogarell O, Oertel WH. Costs of drug treatment in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1998; 13(2):249-54.
- Dunne MJ. Block of ATP-regulated potassium channels by phentolamine and others alpha-adrenoceptor antagonists. *Br J Pharmacol*. 1991; 103(4):1847-50.
- Edmondson DE, De Colibus L, Binda C, Li M, Mattevi A. New insights into the structures and functions of human monoamine oxidase A and B. *J Neural Transm*. 2007; 114(6):703-5.
- Edwards MM. Imidazole ligands and feeding behaviour: the role of imidazole binding sites. Ph.D.thesis, University of Bristol, Bristol, UK, 2003.
- Eiben AE, Smith JE. *Introduction to Evolutionary Computing*. Springer-Verlag: New York, 2003.
- Ernsberger P, Meeley MP, Mann JJ, Reis DJ. Clonidine binds to imidazole binding sites as well as alpha 2-adrenoceptors in the ventrolateral medulla. *Eur J Pharmacol*. 1987; 134(1):1-13.
- Farrer MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(4):306-18.

Fernandez HH, Chen JJ. Monoamine oxidase inhibitors: Current and emerging agents for Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol.* 2007; 30(3):150-68.

Finberg JP, Tenne M, Youdim MB. Tyramine antagonistic properties of AGN 1135, an irreversible inhibitor of monoamine oxidase type B. *Br J Pharmacol.* 1981; 73(1):65-74.

Finberg JP, Youdim MB. Pharmacological properties of the anti-Parkinson drug rasagiline; modification of endogenous brain amines, reserpine reversal, serotonergic and dopaminergic behaviours. *Neuropharmacology.* 2002; 43(7):1110-8.

Foley P, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P. MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders? *Parkinsonism Relat Disord.* 2000; 6(1):25-47.

Fowler CJ, Mantle TJ, Tipton KF. The nature of the inhibition of the rat liver monoamine oxidase types A and B by the acetylenic inhibitors clorgyline, l-deprenyl and pargyline. *Biochem Pharmacol.* 1982; 31(22):3555-61.

Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shaw DE, Shelley M, Perry JK, Francis P, Shenkin PS. Glide: a new Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem.* 2004; 47(7):1739-49.

Fritz RR, Abell CW, Patel NT, Gessner W, Brossi A. Metabolism of the neurotoxin in MPTP, by human liver monoamine oxidase B. *FEBS Lett.* 1985; 186(2):224-8.

Gaspar A, Silva T, Yáñez M, Vina D, Orallo F, Ortuso F, Uriarte E, Alcaro S, Borges F. Chromone, a privileged scaffold for the development of monoamine oxidase inhibitors. *J Med Chem.* 2011; 54(14):5165-73.

Glover V, Sandler M, Owen F, Riley GJ. Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature.* 1977; 265(5589):80-1.

Grimsby J, Lan NC, Neve R, Chen K, Shih JC. Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA. *J Neurochem.* 1990; 55(4):1166-9.

Grimsby J, Chen K, Wang LJ, Lan NC, Shih JC. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(9):3637-41.

Gustafson I, Miyauchi Y, Wieloch TW. Postischemic administration of idazoxan, an alpha2-adrenergic receptor antagonist, decrease neuronal damage in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989; 9(2):171-4.

Heberlé G, De Azevedo WF Jr. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. *Curr Med Chem.* 2011; 18(9):1339-52.

Holt A, Wieland B, Baker GB. Allosteric modulation of semicarbazidesensitive amine oxidase activities in vitro by imidazoline receptors ligands. *Br J Pharmacol.* 2004; 143(4):495-507.

Hosseini AR, King PR, Louis WJ, Gundlach AL. [3H]2-(2-Benzofuranyl)-2-imidazoline, a highly selective radioligand for I2-imidazoline receptor binding sites. *Studies in rabbit kidney membranes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997; 355(1):131-8.

Hsu YP, Weyler W, Chen S, Sims KB, Rinehart WB, Utterback MC, Powell JF, Breakefield XO. Structural features of human monoamine oxidase A elucidated from cDNA and peptide sequences. *J Neurochem.* 1998; 51(4):1321-4.

Hudson AL, Gough R, Tyacke R, Lione L, Lallies M, Lewis J, Husbands S, Knight P, Murray F, Hutson P, Nutt DJ. Novel selective compounds for the investigation of imidazoline receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 881:81-91.

Husbands SM, Glennon RA, Gorgerat S, Gough R, Tyacke R, Crosby J, Nutt DJ, Lewis JW, Hudson AL. Beta-carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Depend.* 2001; 64(2):203-8.

Ibbotson T, Edwards G, Weston AH. Antagonism of levromakalim by imidazoline- and guanidine-derivatives in rat portal vein: involvement of the delayed rectifier. *Br J Pharmacol.* 1993; 110(4):1556-64.

Irwin JJ, Shoichet BK. ZINC - a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model.* 2005;45(1):177-82.

Ito A, Kuwahara T, Inadome S, Sagara Y. Molecular cloning of a cDNA for rat liver monoamine oxidase B. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 157(3):970-6.

Jahng JW, Houpt TA, Wessel TC, Chen K, Shih JC, Joh TH. Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *Synapse.* 1997; 25(1):30-6.

Johnston JP. Some observations up on a new inhibitors of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem. Pharmacol.* 1968; 17(7):1285-97.

Kearney EB, Salach JI, Walker WH, Seng RL, Kenney W, Zeszotek E, Singer TP. The covalently-bound flavin of hepatic monoamine oxidase. 1. Isolation and sequence of a flavin peptide and evidence for binding at the 8alpha position. *Eur J Biochem.* 1971; 24(2):321-7.

Kimura A, Tyacke RJ, Minchin MC, Nutt DJ, Hudson AL. Identification of an I(2) binding protein from rabbit brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1009:364-6.

Knoll J, Ecsery Z, Kelemen K, Nievel J, Knoll B. Phenylisopropylmethylpropinylamine (E-250), a new spectrum psychic energizer. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1965; 155(1):154-64.

Knoll J, Magyar K. Some puzzling pharmacologic effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 1972; 5:393-408.

Koza JR, Bennet D, Keane M. Genetic programming III: Darwinian invention and problem solving. 1999; New York: Morgan Kaufmann Publishers.

Kuwahara T, Takamoto S, Ito A. Primary structure of rat monoamine oxidase A deduced from cDNA and its expression in rat tissues. *Agric Biol Chem.* 1990; 54(1):253-7.

Lalies MD, Hibell A, Hudson AL, Nutt DJ. Inhibition of central monoamine oxidase by imidazoline₂ site-selective ligands. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 881:114-7.

Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med.* 1998; 339(15):1044-53.

Lanier SM, Ivkovic B, Singh I, Neumeyer JL, Bakthavachalam V. Visualization of multiple imidazoline/guanidinium-receptive sites. *J Biol Chem.* 1993; 268(21):16047-51.

Layton B. Recent patents in bionanotechnologies: nanolithography, bionanocomposites, cell-based computing and entropy production. *Recent Pat Nanotechnol.* 2008; 2(2):72-83.

Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. **Science.** 1994; 263(5149):966-9.

Limon I, Coupry I, Lanier SM, Parini A. Purification and characterization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive site from rabbit kidney. *J Biol Chem.* 1992; 267(30):21645-9.

Limon-Boulez I, Tesson F, Gargalidis-Moudanos C, Parini A. I₂-imidazoline binding sites: Relationship with different monoamine oxidase domains and identification of histidine residues mediating ligand binding regulation by H⁺. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 276(2):359-64.

Lione LA, Nutt DJ, Hudson AL. [³H]2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline: a new selective high affinity radioligand for the study of rabbit brain imidazoline I₂ receptors. *Eur J Pharmacol.* 1996; 304(1-3):221-9.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46(1-3):3-26.

Ma J, Yoshimura M, Yamashita E, Nakagawa A, Ito A, Tsukihara T. Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrate and inhibitors. *J Mol Biol.* 2004; 338(1):103-102.

MacKinnon AC, Brown CM, Spedding M, Kilpatrick AT. [³H]-Idazoxan binds with high affinity to two sites on hamster adipocytes: an alpha 2-adrenoceptor and a non-adrenoceptor site. *Br J Pharmacol.* 1989; 98(4):1143-50.

Maiese K, Pek L, Berger SB, Reis DJ. Reduction in focal cerebral ischemic by agents acting at imidazole receptors. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992; 12(1):53-63.

Michel MC, Brodde OE, Schnepel B, Behrendt J, Tschada R, Motulsky HJ, Insel PA. [³H]-Idazoxan and some other alpha 2-adrenergic drugs also binds with high affinity to a nonadrenergic site. *Mol Pharmacol.* 1989; 35(3):324-30.

Michel MC, Ernsberger P. Keeping an eye on the I site: imidazoline-preferring receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1992; 13(10):369-70.

Miralles A, Olmos G, Sastre M, Barturen F, Martin I, Garcia-Sevilla JA. Discrimination and pharmacologic characterization of I2-imidazoline sites with [³H]idazoxan and alpha-2 adrenoceptors with [³H]RX821002 (2-methoxy idazoxan) in the human and rat barins. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 264(3):1187-97.

Miteva MA, Violas S, Montes M, Gomez D, Tuffery P, Villoutreix BO. FAF-Drugs : free ADME/tox filtering of compound collections. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34:W738-744.

Morgan NG, Chan SL, Brown CA, Tsoli E. Characterization of the imidazoline binding site involved in regulation of insulin secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 763:361-73.

Musgrave IF, Badoer E. Harmane produces hypotension following microinjection into the RVLM: possible role of I(1)-imidazoline receptors. *Br J Pharmacol.* 2000; 129(6):1057-9.

Nagatsu T. Progress in monoamine oxidase (MAO) research in relation to genetic engineering. *Neurotoxicology.* 2004; 25(1-2):11-20.

Neff NH, Yang HY. Another look at the monoamine oxidase and the monoamine oxidase inhibitors drugs. *Life Sci.* 1974; 14(11):2061-74.

O'Carroll AM, Fowler CJ, Philips JP, Tobia I, Tipton KF. The deamination of dopamine by human brain monoamine oxidase. Specificity for the two enzyme forms in seven brain regions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1983; 322(3):198-202.

Olmos G, Gabilondo AM, Miralles A, Escriba PV, García-Sevilla JA. Chronic treatment with the monoamine oxidase inhibitors clorgyline and pargyline down-regulates non-adrenergic [³H]-idazoxan binding sites in the rat brain. *Br J Pharmacol.* 1993; 108(3):597-603.

Olmos G, Alemany R, García-Sevilla JA. Pharmacological and molecular discrimination of brain I2-imidazoline receptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996; 54(6):709-16.

Olmos G, Alemany R, Boronat MA, García-Sevilla JA. Pharmacologic and molecular discrimination of I2-imidazoline receptors subtypes. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 881:144-160.

Otyepka M, Krystof V, Havlíček L, Siglerová V, Strnad M, Koca J (2000) Docking-based development of purine-like inhibitors of cyclin-dependent kinase-2. *J Med Chem* 43(13):2506-13.

Ozaita A, Olmos G, Boronat MA, Lizcano JM, Unzeta M, García-Sevilla JA. Inhibitors of MAO A and B activities by imidazol(ine)/guanidine receptive drugs, nature of the interaction and distinction from I2-imidazoline receptors in rat liver. *Br J Pharmacol.* 1997; 121(5):901-12.

Parini A, Moudanos CG, Pizzinat N, Lanier SM. The elusive family of imidazoline binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.* 1996; 17(1):13-6.

Powell JF, Hsu YP, Weyler W, Chen SA, Salach J, Andrikopoulos K, Mallet J, Breakefield XO. The primary structure of bovine monoamine oxidase type A. Comparison with peptide sequences of bovine monoamine oxidase type B and other flavoenzymes. *Biochem J.* 1989; 259(2):407-13.

Raasch W, Muhle H, Dominiak P. Modulation of MAO activity by imidazoline and guanidine derivatives. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 881:313-31.

Raddatz R, Parini A, Lanier SM. Imidazoline/guanidinium binding domains on monoamine oxidases. Relationship to subtypes of imidazoline-binding proteins and tissue-specific interaction of imidazoline ligands with monoamine oxidase B. *J Biol Chem.* 1995; 270(46):27961-8.

Raddatz R, Lanier SM. Relationship between imidazoline/guanidinium receptive sites and monoamine oxidase A and B. *Neurochem Int.* 1997a; 30(1):109-17.

Raddatz R, Parini A, Lanier SM. Localization of the imidazoline binding domain on monoamine oxidase B. *Mol Pharmacol.* 1997b; 52(4):549-53.

Raddatz R, Savic SL, Bakthavachalam V, Lesnick J, Jasper JR, McGrath CR, Parini A, Lanier SM. Imidazoline binding domains on monoamine oxidase B and subpopulations of enzyme. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292(3):1135-45.

Regunathan S, Evinger MJ, Meeley MP, Reis DJ. Effect of clonidine and other imidazole-receptor binding agents on second messenger systems and calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42(10):2011-18.

Regunathan S, Feinstein DL, Reis DJ. Expression of non-adrenergic imidazoline sites in rat cerebral cortical astrocytes. *J Neurosci Res.* 1993a; 34(6):681-8.

Regunathan S, Meeley MP, Reis DJ. Expression of non-adrenergic imidazoline sites in chromaffin cells and mitochondrial membranes of bovine adrenal medulla. *Biochem Pharmacol.* 1993b; 45(8):1667-75.

Regunathan S, Nassir Y, Sundaram K, Vaughan ED Jr, Reis DJ, Felsen D. Expression of I2-imidazoline sites in rat prostate. Effect of castration and aging. *Biochem Pharmacol.* 1996; 51(4):455-9.

Reis DJ, Li G, Regunathan S. Endogenous ligands of imidazoline receptors: classic and immunoreactive clonidine-displacing substance and agmatine. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 763:295-313.

Remaury A, Ordener C, Shih J, Parini A. Relationship between I2 imidazoline binding sites and monoamine oxidase B in liver. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 881:32-4.

Remaury A, Raddatz R, Ordener C, Savic S, Shih JC, Chen K, Seif I, De Maeyer E, Lanier SM, Parini A. Analysis of the pharmacological and molecular heterogeneity of I(2)-imidazoline binding proteins using monoamine oxidase-deficient mouse model. *Mol Pharmacol.* 2000; 58(5):1085-90.

Reynolds GP, Riederer P, Sandler M, Jellinger K, Seemann D. Amphetamine and 2-phenylethylamine in post mortem Parkinson brain after l-deprenyl administration. *J Neural Transm.* 1978; 43(3-4):271-7

Robinson DS. Monoamine oxidase inhibitors: a new generation. *Psychopharmacol Bull.* 2002; 36(3):124-38.

Robinson ES, Anderson NJ, Crosby J, Nutt DJ, Hudson AL. Endogenous β -carbolines as clonidine-displacing substances. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1009:157-66.

Rommelspacher H, Kauffmann H, Cohnitz CH, Coper H. Pharmacological properties of tetrahydronorharmane (tryptoline). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1977; 298(2):83-91.

Sastre M, García-Sevilla JA. Opposite age-dependent changes of α 2A-adrenoceptors and non-adrenoceptors [3 H]-idazoxan binding sites (I2-imidazoline sites) in the human brain: strong correlation of I2 with Mao-B sites. *J Neurochem.* 1993; 61(3):881-9.

Sastre M, García-Sevilla JA. Densities of I2-imidazoline receptors, α 2-adrenoceptors and monoamine oxidase B in brains of suicidal victims. *Neurochem Int.* 1997; 30(1):63-72.

Saura J, Luque JM, Cesura AM, Da Prada M, Chan-Palay V, Huber G, Löffler J, Richards JG. Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. *Neuroscience.* 1994; 62(1):15-30.

Saura J, Bleuel Z, Ulrich J, Mendelowitsch A, Chen K, Shih JC, Malherbe P, Da Prada M, Richards JG. Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidase A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization. *Neuroscience.* 1996; 70(3):755-74.

Scheer M, Grote A, Chang A, Schomburg I, Munaretto C, Rother M, Söhngen C, Stelzer M, Thiele J, Schomburg D. BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(Database issue): D670-6.

Selikoff IJ, Robitzek EH, Ornstein GG. Toxicity of hydrazine derivatives of isonicotinic acid in the chemotherapy of human tuberculosis; a preliminary report. *Q Bull Sea View Hosp.* 1952; 13(1):17-26.

Shelke SM, Bhosale SH, Dash RC, Suryawanshi MR, Mahadik KR. Exploration of new scaffolds as potential MAO-A inhibitors using pharmacophore and 3D-QSAR based in silico screening. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011; 21(8): 2419-24.

Shih JC, Chen K, Ridd MJ. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Ann.Rev.Neurosci.* 1999;22:197-217.

Shoichet BK. Virtual screening of chemical libraries. *Nature.* 2004;16(432):862-865.

Siderowf AD, Holloway RG, Stern MB. Cost-effectiveness analysis in Parkinson's disease: determining the value of interventions. *Mov Disord.* 2000; 15(3):439-45.

Silveira NJ, Uchoa HB, Pereira JH, Canduri F, Basso LA, Palma MS, Santos DS, De Azevedo WF Jr. Molecular models of protein targets from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Model.* 2005; 11(2):160-6.

Simpson LL. Evidence that deprenyl, a type B monoamine oxidase inhibitor is an indirectly acting sympathomimetic amine. *Biochem Pharmacol.* 1978; 27(11):1591-5.

Sivasubramaniam SD, Finch CC, Rodriguez MJ, Mahy N, Billett EE. A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B and protein in non-CNS human tissues. *Cell Tissue Res.* 2003; 313(3):291-300.

Son SY, Ma J, Kondou Y, Yoshimura M, Yamashita E, Tsukihara T. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrate/inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 105(15):5739-44.

Sterling J, Veinberg A, Lerner D, Goldenberg W, Levy R, Youdim M, Finberg J. (R)(+)-N-Propargyl-1-aminoindan (resagiline) and derivatives: highly selective and potent inhibitors of monoamine oxidase B. *J Neural Transm Suppl.* 1998; 52: 301-305.

Tesson F, Prip-Buus C, Lemoine A, Pegorier JP, Parini A. Subcellular distribution of imidazoline-guanidinium-receptive sites in human and rabbit liver. *J Biol Chem.* 1991a; 266(1):155-60.

Tesson F, Parini A. Identification of an imidazoline-guanidinium receptive sites in mitochondria from rabbit cerebral cortex. *Eur J Pharmacol.* 1991b; 208(1):81-3.

Tesson F, Limon I, Parini A. Tissue-specific localization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive sites. *Eur J Pharmacol.* 1992; 219(2):335-8.

Tesson F, Limon-Boulez I, Urban P, Puype M, Vandekerckhove J, Coupry I, Pompon D, Parini A. Localization of 12-imidazoline binding sites on monoamine oxidase. *J Biol Chem.* 1995; 270(17):9856-61.

Tetrud JW, Langston JW. The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson's disease. *Science.* 1989; 245(4917):519-22.

Thomsen R, Christensen MHJ. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Med Chem.* 2006; 49(11):3315-21.

Timmermans PB, van Zwieten PA. Alpha 2 adrenoceptors: classification, localization, mechanisms and target for drugs. *J Med Chem.* 1982; 25(12):1389-401.

Timmers, LFS, Pauli I, Caceres R.A, De Azevedo WF Jr. Drug-Binding Databases. *Curr Drug Targets.* 2008; 9(12):1092-1099

Tipton KF, McCrodden JM, Youdim MB. Oxidation and enzyme-activated irreversible inhibition of rat liver monoamine oxidase-B by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem J.* 1986; 240(2):379-83.

Tipton KF, O'Carroll AM, McCrodden JM. The catalytic behavior of monoamine oxidase. *J Neural Transm Suppl.* 1987; 23:25-35.

Wallace AC, Laskowski RA & Thornton JM. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 1995; 8(2):127-34.

Wasserman PD. *Neural computing: theory and practice.* New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.

Waters CH, Sethi KD, Hauser RA, Molho E, Bertoni JM; Zydis Selegiline Study Group. Zydis selegiline reduces off time in Parkinson's Disease patients with motor fluctuations: a 3-month, randomized, placebo-controlled study. *Mov Disord.* 2004; 19(4):426-32.

Westlund KN, Denney RM, Kochersperger LM, Rose RM, Abell CM. Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science.* 1985; 230(4722):181-3.

Wikberg JE, Uhlén S. Further characterization of the guinea pig cerebral cortex idazoxan receptor: Solubilization, distinction from the imidazole site, and demonstration of cirazoline as an idazoxan receptor-selective drug. *J Neurochem.* 1990; 55(1):192-203.

Yablonsky F, Dausse JP. Non-adrenergic binding sites for the "alpha 2- antagonist" [³H]-Idazoxan in the rabbit urethral smooth muscle. Pharmacological and biochemical characterization. *Biochem Pharmacol.* 1991; 41(5):701-7.

Yamada M, Yasuhara H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicol.* 2004; 25(1-2):215-21.

Youdim MB, Gross A, Finberg JP. Rasagiline [N-propargyl-1R(+)-aminoindan], a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B. *Br J Pharmacol.* 2001; 132(2):500-6.

Youdim MB, Weinstock M. Therapeutic applications of selective and nonselective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. *Neurotoxicology.* 2004; 25(1-2):243-50.

Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci.* 2006a; 7(4):295-309.

Youdim MB, Bakhle YS. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br J Pharmacol.* 2006b; 147 Suppl 1:S287-96.

Zisook S. Clinical overview of monoamine oxidase inhibitors. *Psychosomatics.* 1985; 26(3):240-6,251.

Zonnenchein R, Diamant S, Atlas D. Imidazoline receptors in rat liver cells: a novel receptor or a subtype of alpha 2-adrenoceptors? *Eur J Pharmacol.* 1990; 190(1-2):203-15.

Anexos

Anexo A - Targeting imidazoline site on monoamine oxidase B through molecular docking simulations

Anexo B - Recent progress of molecular docking simulations applied to development of drugs

Anexo A

Targeting imidazoline site on
monoamine oxidase B
through molecular docking
simulations

Fernanda Pretto Moraes, Walter
Filgueira de Azevedo Jr

Artigo submetido ao *Journal of
Molecular Modeling*

Targeting imidazoline site on monoamine oxidase B through molecular docking simulations

Fernanda Pretto Moraes^{1,2} and Walter Filgueira de Azevedo Jr.^{1,2*}

¹Faculdade de Biociências, Laboratório de Bioquímica Estrutural (LaBioQuest), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*To whom correspondence may be addressed: Walter Filgueira de Azevedo Jr.

Faculdade de Biociências-PUCRS. Av. Ipiranga 6681 – Faculdade de Biociências – Prédio 12C, Porto Alegre RS 90619-900, Brazil. Phone/Fax: +55 51 33204529; E-mail address: walter@azevedolab.net

Abstract

Monoamine Oxidase (MAO) is an enzyme of major importance in neurochemistry, because it catalyzes the inactivation pathway for the catecholamine neurotransmitters, noradrenaline, adrenaline and dopamine. In the last decade it was demonstrated that imidazoline derivatives were able to inhibit MAO activity. Furthermore, crystallographic studies identified the imidazoline-binding domain on monoamine oxidase B (MAO-B), which opens the possibility of molecular docking studies focused on this binding site. The goal of the present study is to identify new potential inhibitors for MAO-B. In addition, we are also interested in establishing a fast and reliable computation methodology to pave the way for future molecular docking simulations focused on the imidazoline-binding site of this enzyme. We used the program 'molegro virtual docker' (MVD) in all simulations described here. All results indicate that simplex evolution algorithm is able to successfully simulate the protein-ligand interactions for MAO-B. In addition, a scoring function implemented in the program MVD presents high correlation coefficient with experimental activity of MAO-B inhibitors. Taken together, our results identified a new family of potential MAO-B inhibitors and mapped important residues for intermolecular interactions between this enzyme and ligands.

Keywords: Monoamine Oxidase, imidazoline sites, molecular docking, virtual screening.

Introduction

Monoamine oxidase (monoamine: oxygen oxidoreductase (deaminating), EC 1.3.3.4, MAO) is a flavindependent enzyme that catalyzes the oxidative deamination of important amine neurotransmitters, such as dopamine, noradrenaline, and serotonin. For a recent review see [1]. These important protein targets are found in the external mitochondrial membrane as two isoenzymes, MAO-A and MAO-B, that exhibit differing substrate and inhibitor specificities [2-8]. MAO-B is selective for dopamine whereas MAO-A is selective for serotonin and noradrenaline. MAOs are the most important enzymes in metabolizing monoamine neurotransmitters and an essential factor in the etiology of age-regulated neurodegenerative diseases, such as such as Alzheimer's and Parkinson's diseases [7-8]. Inhibition of MAO-A and B causes amplification of the existing amounts of monoamine neurotransmitters in the brain for the therapy of psycho-neurological disorders. Several MAO-B inhibitors are currently useful in Parkinson's disease [5, 9, 10].

Several molecular docking studies have been performed on MAOs [11-21], none of them was focused on the imidazoline binding site on MAO-B, also known as I2 binding site [22-26]. Although experimental evidence suggested the importance of this binding site for inhibitory activity against MAO-B [27-30], that could be used for molecular docking studies. Recent X-ray crystallographic and biochemical studies [31] revealed the structural basis for an interesting potentiation of MAO-B inhibition due to the presence of a ligand in the substrate binding site and 2-(2-Benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI) in the imidazoline site. Analysis of the structure of the 2-BFI complex with tranylcypromine-inhibited MAO-B showed that the presence of tranylcypromine modifies the positioning of Leu199 in the entrance of the active site, generating a closed conformation for MAO-B. This form allows tight binding of the reversible inhibitor 2-BFI with 1000 fold increase in the affinity [31]. Furthermore, this study suggested that a new generation of MAO-B inhibitors could be obtained focusing on the entrance of the active site, the imidazoline binding site, which motivated the present study.

MAO-B is composed of three structural domains, as shown in Figure 1. Briefly, the substrate domain is composed of residues Phe 103, Pro 104, Trp 119, Leu 164, Leu 167, Leu 171, Phe 168, Ile 199, Ile 316 and Tyr 326. The flavin domain is composed of the flavin group covalently bound to Cys397. There is also a transmembrane domain, composed by

alpha helices. The substrate entrance is close to the intersection of the enzyme with mitochondrial surface [9, 31].

Molecular docking simulation (MDS) is a computational methodology that provides automatic means to determine the conformation of a proteins-ligand complex. Considering protein-ligand interactions, it is possible to visualize that this computer simulation is equivalent to the key-and-lock problem, where the lock is the protein and the key the ligand. The main objective of the MDS is to adjust the position of the ligand (key) in the protein (lock). In a typical MDS it is generated many potential positions for the ligand in the protein, known as poses. Consequently, it is necessary to have a model, which will allow evaluation of all several possible positions for the ligand, and then choose the best position. This model of selection could be expressed as an energy function [32] or a scoring function [33-38] not necessarily related to an energy function.

Here we applied molecular docking search engines and empirical scoring functions implemented in the program molegro virtual docker [39-41] to evaluate the interaction of MAO-B with ligands. The goals of the present paper are the following: 1) To establish a fast and reliable molecular docking protocol to identify ligand position in the imidazole-binding site on MAO-B. 2) To apply this docking protocol to predict ligand-binding affinity, and 3) to identify new potential MAO-B inhibitors, with focus on the imidazoline-binding site. We describe an optimized molecular docking protocol that was able to predict ligand position with RMSD lower than 0.3 Å when compared with the crystallographic structure. This docking protocol was able to predict inhibitory activity, further validating this docking protocol. Application of this reliable protocol was able to identify new potential MAO-B inhibitors. Their intermolecular interactions and structural features are discussed.

Materials and Methods

Re-docking and cross-Docking

MVD [39-41] is one of the available commercial programs for docking simulations based on evolutionary algorithms. Recent evaluation of MVD strongly indicates that it is capable of superior overall performance when compared with AUTODOCK, SURFLEX, FLEXX and GOLD [39-42]. MVD brings implementation of four search algorithms to find ligand position and orientation. They are: MOLDOCK optimizer (implementation of differential evolution algorithm), MOLDOCK simplex evolution (implementation of downhill

simplex method), iterated simplex, and iterated simplex (with ant colony optimization) [39-41].

In this study, prior to MDS, all atom types and the bond orders were corrected to both ligand and monoamine oxidase B structures using the MVD automatic preparation function [39]. For each complex, the hydrogen atoms were added and the MVD default charges were assigned. This automatic preparation of the structures was also applied to all ligands used in the test set and virtual screening (VS) (described below). Molecular cavities were detected using the grid-based cavity prediction algorithm. All water molecules were deleted from the original PDB files for re-docking and cross-docking (described below) simulations. Re-docking simulations of the ligand 2-BFI against the imidazoline binding site on MAO-B were carried out using the atomic coordinates of 2XCG [31].

In addition to re-docking, a procedure called "cross-docking" can also be used to further validate a docking protocol. Considering that several crystallographic structures are available for the same protein, cross-docking can be applied. This procedure involves docking a number of ligands found in a variety of crystal structures of a protein identical to a single rigid protein crystallographic conformation [43]. When a protein target presents major conformational changes upon ligand binding, a significant difference is expected between the crystallographic and docked structures. In the cross-docking simulations we used 10 crystallographic structures (PDB access codes: 1OJ9, 2VRL, 2VZ2, 2XFN, 2XFO, 2XFP, 2XFQ, 2XFU, 3PO7, 2VRM). Re-docking and cross-docking are the initial stages of all VS projects. The overall scheme is shown in Figure 2, and it has been fully described elsewhere [44]. Briefly, **Phase 1** is focused on selection and validation of a docking protocol, as described above. **Phase 1** ends when an adequate protocol is found (selection criterion RMSD < 2.0 Å). It should be pointed out that the RMSD criterion is dependent on the number of torsion angles, and a less demanding criterion may be adopted for re-docking of a ligand with a number of torsion angles higher than 10 [40, 41]. Once a docking protocol is chosen we select a small-molecule database to be used in the screening (**phase 2**). In **phase 3**, we start docking simulations for each ligand present in the selected database. During a typical docking simulation several orientations can be obtained for each ligand. Here we selected the one with the lowest scoring function. The scoring function used by MVD improves accuracy of scoring functions with a new hydrogen bonding term and new charge schemes. Four scoring functions are implemented in the MVD, including MOLDOCK score and PLANTS score [39]. These two functions offer grid-based versions, in which hydrogen bond directionality is not considered.

To further improve docking accuracy, a re-ranking scoring function was used. This function identifies the most promising docking solution from the solutions obtained by the docking algorithm [39]. Re-rank score includes to the docking scoring function terms, such as a sp²-sp² torsion term and a Lennard-Jones 12-6 potential. The reranking score function is computationally more expensive than the scoring functions (MOLDOCK and PLANTS scores) used during the docking simulation but it is usually better than the docking score function at determining the best pose among several poses originating from the same ligand and also for evaluating ligand-binding affinity. Furthermore, due to stochastic nature of the search algorithm, we applied the same VS protocol 16 times, running the best docking protocol in 16 computers in parallel (coarse-grain parallelism) and only considered a compound as a hit if it is present in the majority of the VS results. In the present work, all simulations were performed in 16 iMac computers (Intel Processor Core 2 Duo, 2.66 GHz, 2 GB SDRAM DDR3 1066 MHz).

After identification of potential inhibitors by MDSs, the best scored ligands can be submitted to the web server FAF-Drugs [45] in order to assess physical-chemical properties (phase 4). These are key properties that need to be considered in early stages of the drug discovery process, and FAF-Drugs allows users to filter molecules via simple rules such as molecular weight, polar surface area, logP and number of rotatable bonds. The ligands were filtered following the Lipinski's rule of five (RO5). RO5 advocates that drugs which present oral bioavailability, in general, follow: molecular weight less or equal to 500, LogP less or equal to 5, number of hydrogen bond donor groups less or equal to 5 and number of hydrogen bond acceptor groups less or equal to 10 [46].

To confirm the ability of the MVD program to evaluate the inhibitory activity of a ligand bound to MAO-B we selected 13 MAO-B inhibitors for which experimental information for their inhibition activity (IC₅₀) was available. This information was retrieved from the BRENDA [47]. We used the program ACD/ChemSketch from Advanced Chemistry Development (Toronto, Canada)(http://www.acdlabs.com/products/draw_nom/) to generate inhibitor structures and submitted them to the automatic preparation of the structures of MVD (described above). From now on this ensemble of structures will be referred as test set.

In order to identify new commercial available MAO-B inhibitors we focused our VS efforts on the SIGMA library. This small-molecule library presents 15,186 compounds. We downloaded these compounds in the structure-data file (SDF) format from the ZINC database [48-50]. The atomic coordinates for the structure 2XCG [31] was used as target for VS and

test set studies, water molecules and ligands were deleted from the structure. We used the best docking protocol with re-ranking score function identified in the phase 1 to evaluate binding affinity.

Results and discussion

Re-docking and cross-docking

One of the most important results derived from the several applications of MVD program is the comparison of re-docking simulations between MVD and other docking programs, such as GOLD, FLEXX, GLIDE, and AUTODOCK [39-42]. These comparisons strongly indicated that the MVD is able to obtain lower RMSDs in the great majority of the analyzed crystallographic structures (re-docking simulations). In addition, MVD not only presents a better overall performance in re-docking simulations, but it is also faster than AUTODOCK [42], one of the first MDS program. These results demonstrate that MVD is reliable; therefore, we used it in the present work.

Initially, a search for the best molecular docking protocol was performed. The structure of 2-BFI in complex with tranylcypromine-inhibited MAO-B was used for re-docking simulations. The key criterion describing the quality of a MDS is the RMSD. In molecular docking applications, the best binary complex is the one closer to the structure determined by x-ray crystallography. Analysis of the re-docking results for the combination of 4 search algorithms and 4 scoring functions (a total of 16 different docking protocols) generated RMSD from 0.2 to 12.08 Å. Table 1 shows the RMSD for all docking protocols. The best results were obtained for the following search engines: MOLDOCK SE, MOLDOCK optimizer, and iterated simplex. Iterated simplex with ant colony optimization generated the worst RMSD (12.08 Å). The parameters for docking, especially the search engine features, were optimized by running several MDSs on the complex structure. The following parameters and their combinations were varied: radius of the docking sphere, number of runs, maximum number of iterations, and maximum population size. The optimized parameters for the docking are the following:

Scoring function

Empirical scoring function: Re-rank score (used for ranking the MDS results)

Binding site

Origin: $x= 50.63$; $y= 161.17$ and $z= 31.34$ Å

Radius: 10 Å

Search algorithm

Algorithm: MOLDOCK SE

Number of runs: 10

Constrain poses to cavity: Enabled

Parameter settings

Max iterations: 1500

Max population size = 50

Pose generation

Energy threshold: 100.00

Simplex evolution

Max steps: 300

Neighbour distance factor: 1.00 .

Figure 3 shows the docking sphere used in the re-docking simulations. Since the combination of MOLDOCK SE and re-rank score, generated very low RMSD (0.2 Å) we chose this docking protocol and used it in all further MDSs. Cross-docking simulations for 10 MAO-B complexes using this protocol generated RMSDs from 1.45 to 1.80 Å, further validating the present docking protocol.

Relationships between the MAO-B inhibition and re-rank score

Predicting the ligand-binding affinity based on a static conformation of the ligand is a complex task. For example, energetic contributions from solvent interactions and entropy contributions are complicated to handle in the simplified models used in MDS. While the re-rank score in MVD provides an approximation of the potency of the intermolecular interaction, it is not calibrated in physical-chemical units and it does not take intricate contributions (such as entropy) into account. Even though the re-rank score might be successful in ranking different poses of the same ligand, it might be less successful in ranking poses of different ligands. So, to test whether re-ranking score is able to predict ligand-binding affinity we applied the best docking protocol to a test set of 13 ligands for which experimental information was available.

It is expected that scoring functions show a correlation with inhibitory activity (IC₅₀). To carry out comparisons we used pIC₅₀, which is the log (IC₅₀), as shown on Table 2. Since there is no direct significant relationship between the two datasets, we have to calculate the Spearman's rank order correlation coefficient to evaluate the statistical significance of the

relationship between these two independent variables (re-rank score and pIC50). The equation for this correlation coefficient is as follows,

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{j=1}^N [r(x_j) - r(y_j)]}{N^3 - N}$$

where N is the number of pairs, 13 in our case, the variables r(x_j) and r(y_j) are the rank of the pIC50 and the rerank score of the jth sample in the dataset. [22].

Analysis of the Spearman's rank correlation coefficient for this dataset (table 2) generated a $\rho = 0.8$, which is higher than the critical value at the 0.002 level of significance. It implies that the re-rank score of MVD can be applied for activity prediction.

Furthermore, application of the best docking protocol to simulate the interaction of 2-BFI with the structure of Ile199Ala mutant of human MAO B (PDB access code: 2XFO) generated a re-rank score of -72.06, higher than the re-rerank for 2-BFI in complex with tranlycypromine-inhibited MAO-B (-86.57). Previously published study [31] indicated that 2-BFI binds to the mutant enzyme weakly with a K_i of approximately 58 μ M, whereas 2-BFI binds to tranlycypromine inhibited human MAO B with a K_d value of 9 nM, which is nearly 1000-fold increase in binding affinity for 2- BFI on tranlycypromine inhibition specifically observed in human MAO B. These experimental results are in agreement with re-rank scores estimated with MVD. Taken together these results indicate that this docking protocol can also be applied to evaluate the binding-affinity of compounds identified in a VS study.

Virtual screening

VS is a computational approach used to identify potential new inhibitors for a protein target for which the 3D structure is available. It has been successfully applied to identify a plethora of inhibitors [40-41, 50]. Our focus here is on the identification of new potential inhibitors for MAO-B. Although previous VS studies have been performed on the MAO-B [13-15]. There is no docking studies using the combination of simplex evolution search algorithm and MOLDOCK score. Furthermore, this is the first VS study focused on the imidazoline-binding site on MAO-B.

Application of the previously described docking protocol to a database with 15,186 compounds returned as best results 11 compounds, with re-rank score below -100. Among these 11 compounds, 2 stands out, since they were found among the best hits in 14 out of 16

simulations. They are: ZINC00154386 (3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-piperidin-1-ium-4-yl-1,2,4-oxadiazole) and ZINC02387301 (5-[5-(5-formylthiophen-2-yl)thiophen-2-yl]thiophene-2-carbaldehyde)).

We used filtering options of FAF-Drugs [45] to this set of 11 compounds, based on Lipinski's rules [46]. A total of 8 compounds passed to this filter (table 3) (Figures 4A-4H), among them the molecules ZINC00154386 and ZINC02387301. Re-rank scores for these 8 compounds range from -116.958 to -100.029.

Intermolecular interactions

In order to assess intermolecular contacts between the compounds identified in the VS and the MAO-B we used the program LIGPLOT [51]. Analysis of the intermolecular interaction indicates key residues responsible for ligand binding specificity. Binding of 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline to MAO-B is shown in Fig. 5. Intermolecular hydrogen bonds involving residues Tyr326 and Pro102. Van der Waals contacts are present between the ligand and the residues Phe 168, Leu 164, Il 316, Il 199, Leu 171, and Leu 88.

Table 4 shows intermolecular interactions for all eight compounds identified in the VS. All eight compounds present interactions with residues Ile316, Ile199 and Leu88. Out of 8 compounds, 6 show intermolecular interactions with residues Leu171, Leu167, and Leu171. The residue Tyr326 is found in interactions with ligands 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, which strongly indicates the importance of these residues for ligand specificity, as has been suggested from the analysis of the crystallographic structure of 2-BFI in complex with tranylcypromine-inhibited MAO-B [31].

Conclusions

We have used simplex evolution algorithm to carry out flexible docking search for prediction of MAO-B inhibitory activities. The parameters for the flexible docking were optimized to allow us routine work. After that, cross-docking simulations were performed with the imidazole-binding site. We have calculated the rank correlation between the MOLDOCK score of the program MVD and the respective MAO-B inhibitory activity. The calculated correlation coefficients imply that the docking using the combination of simplex evolution algorithm and MOLDOCK score is a suitable technique for making qualitative

predictions about activity. At the same time, the results confirm the assumption that there is a considerable relationship between the IC50 and rerank scores.

We have studied also the influence of key residues on ligand interaction with MAO-B and attempted to predict new possibly active compounds. We have identified two compounds (ZINC00154386 and ZINC02387301) with low re-rank score. Both compounds present intermolecular interactions involving residues Tyr326 and Pro102, as observed for the crystallographic structure 2XCG [31]. Information obtained in this study will be used for designing new MAO-B inhibitors and for additional work in the area of molecular docking simulations.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Ministério de Ciência e Tecnologia (INCT-Tuberculose, CNPq-MCT, Brazil). WFA is senior researcher for CNPq (Brazil). The fellowship from CNPq-Brazil is also acknowledged (FPM).

References

1. Naoi M, Maruyama W (2010) Monoamine oxidase inhibitors as neuroprotective agents in age-dependent neurodegenerative disorders. *Curr Pharm Des.* 16(25):2799-817.
2. Naoi M, Maruyama W, Akao Y, Yi H, Yamaoka Y (2006) Involvement of type A monoamine oxidase in neurodegeneration: regulation of mitochondrial signaling leading to cell death or neuroprotection. *J Neural Transm Suppl.* 71: 67-77.
3. Edmondson DE, Binda C, Mattevi A (2007) Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Arch Biochem Biophys.* 464(2): 269-76.
4. Shih JC, Chen K, Ridd MJ (1999) Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci.* 22: 197-217.
5. Birkmayer W, Knoll J, Riederer P, Youdim MB, Hars V, Marton J (1985) Increased life expectancy resulting from addition of L-deprenyl to Madopar treatment in Parkinson's disease; a long-term study. *J Neural Transm.* 64(2): 113-27.
6. Edmondson DE, Mattevi A, Binda C, Li M, Hubálek F (2004) Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Curr Med Chem.* 11(15): 1983-93.
7. Riederer P, Konradi C, Schay V, Kienzl E, Birkmayer G, Danielczyk W, Sofic E, Youdim MB (1987) Localization of MAO-A and MAO-B in human brain: a step in understanding the therapeutic action of Ldeprenyl. *Adv Neurol.* 45: 111-8.
8. Youdim MBH, Bakhle YS (2006) Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br J Pharmacol.* 147: Suppl 1:S287-96.
9. Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci.* 7(4): 295-309.
10. Riederer P, Lachenmayer L, Laux G (2004) Clinical applications of MAO-inhibitors. *Curr Med Chem.* 11(15): 2033-43.
11. Manley-King CI, Bergh JJ, Petzer JP (2011) Inhibition of monoamine oxidase by C5-substituted phthalimide analogues. *Bioorg Med Chem.* 19(16): 4829-40.
12. Maccioni E, Alcaro S, Cirilli R, Vigo S, Cardia MC, Sanna ML, Meleddu R, Yanez M, Costa G, Casu L, Matyus P, Distinto S (2011) 3-Acetyl-2,5-diaryl-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoles: A New Scaffold for the Selective Inhibition of Monoamine Oxidase B. *J Med Chem.* 54(18): 6394-6398.
13. Gaspar A, Silva T, Yáñez M, Vina D, Orallo F, Ortuso F, Uriarte E, Alcaro S, Borges F (2011) Chromone, a privileged scaffold for the development of monoamine oxidase inhibitors. *J Med Chem.* 54(14): 5165-73.

14. Gaspar A, Teixeira F, Uriarte E, Milhazes N, Melo A, Cordeiro MN, Ortuso F, Alcaro S, Borges F (2011) Towards the discovery of a novel class of monoamine oxidase inhibitors: structure-property-activity and docking studies on chromone amides. *ChemMedChem*. 6(4): 628-32.
15. Shelke SM, Bhosale SH, Dash RC, Suryawanshi MR, Mahadik KR (2011) Exploration of new scaffolds as potential MAO-A inhibitors using pharmacophore and 3D-QSAR based in silico screening. *Bioorg Med Chem Lett*. 21(8): 2419-24.
16. Delogu G, Picciau C, Ferino G, Quezada E, Podda G, Uriarte E, Viña D (2011) Synthesis, human monoamine oxidase inhibitory activity and molecular docking studies of 3-heteroaryl coumarin derivatives. *Eur J Med Chem*. 46(4): 1147-52.
17. Reniers J, Robert S, Frederick R, Masereel B, Vincent S, Wouters J (2011) Synthesis and evaluation of β carboline derivatives as potential monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 19(1): 134-44.
18. Jia Z, Zhu Q (2010) 'Click' assembly of selective inhibitors for MAO-A. *Bioorg Med Chem Lett*. 20(21):6222-5.
19. Khattab SN, Hassan SY, Bekhit AA, El Massry AM, Langer V, Amer A (2010) Synthesis of new series of quinoxaline based MAO-inhibitors and docking studies. *Eur J Med Chem*. 45(10): 4479-89.
20. Maccioni E, Alcaro S, Orallo F, Cardia MC, Distinto S, Costa G, Yanez M, Sanna ML, Vigo S, Meleddu R, Secci D (2010) Synthesis of new 3-aryl-4,5-dihydropyrazole-1-carbothioamide derivatives. An investigation on their ability to inhibit monoamine oxidase. *Eur J Med Chem*. 45(10): 4490-8.
21. Geldenhuys WJ, Darvesh AS, Funk MO, Van der Schyf CJ, Carroll RT (2010) Identification of novel monoamine oxidase B inhibitors by structure-based virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett*. 20(17): 5295-8.
22. Parini A, Moudanos CG, Pizzinat N, Lanier SM (1996) The elusive family of imidazoline binding sites. *Trends in Pharmacol Sci*. 17(1): 13-6.
23. Raddatz R, Parini A, Lanier SM (1997) Localization of the imidazoline binding domain on monoamine oxidase B. *Mol. Pharmacol*. 52(4): 549-53.
24. Lanier SM, Lanier B, Bakthavachalam V, McGrath CR, Neumeyer JL (1995) Use of high affinity, radioiodinated probes for identification of imidazoline/guanidinium receptive sites. *Ann N Y Acad Sci*. 763:106-11.

25. Remaury A, Raddatz R, Ordener C, Savic S, Shih JC, Chen K, Seif I, De Maeyer E, Lanier SM, Parini A (2000) Analysis of the pharmacological and molecular heterogeneity of I(2)-imidazoline-binding proteins using monoamine oxidase-deficient mouse models. *Molec Pharm.* 58, 1085-1090.
26. Anderson NJ, Seif I, Nutt DJ, Hudson AL, Robinson ES (2006) Autoradiographical distribution of imidazoline binding sites in monoamine oxidase A deficient mice. *J Neurochem.* 96(6): 1551-9.
27. Ozaita A, Olmos G, Boronat MA, Lizcano JM, Unzeta M, Garcia-Sevilla JA (1997) Inhibitors of MAO A and B activities by imidazol(ine)/guanidine receptive drugs, nature of the interaction and distinction from I2-imidazoline receptors in rat liver. *Br J Pharmacol.* 121(5): 901-12.
28. Jones TZ, Giurato L, Guccione S, Ramsay RR (2007) Interactions of imidazoline ligands with the active site of purified monoamine oxidase A. *FEBS J.* 274(6): 1567-75.
29. Raddatz R, Parini A, Lanier SM (1995) Imidazoline/guanidinium binding domains on monoamine oxidases. Relationship to subtypes of imidazoline-binding proteins and tissue-specific interaction of imidazoline ligands with monoamine oxidase B. *J Biol Chem.* 270(46): 27961-8.
30. Raddatz R, Savic SL, Bakthavachalam V, Lesnick J, Jasper JR, McGrath CR, Parini A, Lanier SM (2000) Imidazoline-binding domains on monoamine oxidase B and subpopulations of enzyme. *J Pharmacol Exp Ther.* 292(3): 1135-45.
31. Bonivento D, Milczek EM, McDonald GR, Binda C, Holt A, Edmondson DE, Mattevi A (2010) Potentiation of ligand binding through cooperative effects in monoamine oxidase B. *J Biol Chem.* 285(47): 36849-56.
32. Klebe G, Böhm HJ (1997) Energetic and entropic factors determining binding affinity in protein-ligand complexes. *J Recept Signal Transduct Res.* 17(1-3): 459-73.
33. Böhm HJ (1994) The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des.* 8(3): 243-56.
34. Böhm HJ (1996) Current computational tools for de novo ligand design. *Curr Opin Biotechnol* 7(4): 433-6.
35. Böhm HJ (1998) Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. *J Comput Aided Mol Des.* 12(4): 309-23.

36. Stahl M, Böhm HJ (1998) Development of filter functions for protein-ligand docking. *J Mol Graph Model*. 16(3): 121-32.
37. Wang R, Lai L, Wang S (2002) Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des*. 16(1): 11-26.
38. De Azevedo WF Jr, Dias R (2008) Computational methods for calculation ligand-binding affinity. *Curr Drug Targets*. 9(12): 1031-9.
39. Thomsen R, Christensen MH (2006) MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem*. 49(11): 3315-21.
40. Heberlé G, De Azevedo WF Jr (2011) Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. *Curr Med Chem*. 18(9): 1339-52.
41. De Azevedo WF Jr (2010) MolDock applied to structure-based virtual screening. *Curr Drug Targets*. 11(3):327-34.
42. Araújo JQ, Lima JA, Pinto Ada C, de Alencastro RB, Albuquerque MG (2011) Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Model*. 17(6): 1401-12.
43. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shaw DE, Shelley M, Perry JK, Francis P, Shenkin PS (2004) Glide: a new Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem* 47(7): 1739–49.
44. Vianna CP, de Azevedo WF Jr (2011) Identification of new potential Mycobacterium tuberculosis shikimate kinase inhibitors through molecular docking simulations. *J Mol Model*. DOI: 10.1007/s00894-011-1113-5.
45. Miteva MA, Violas S, Montes M, Gomez D, Tuffery P, Villoutreix BO (2006) FAF-drugs: free ADME/tox filtering of compound collections. *Nucleic Acids Res* 34: W738-W744.
46. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 46(1-3):3-26.
47. Scheer M, Grote A, Chang A, Schomburg I, Munaretto C, Rother M, Söhnngen C, Stelzer M, Thiele J, Schomburg D (2011) BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(Database issue): D670-6.

48. Irwin JJ, Shoichet BK (2005) ZINC - a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* 45(1):177–82.
49. Timmers LF, Pauli I, Caceres RA, de Azevedo WF Jr (2008) Drug-binding databases. *Curr Drug Targets* 9(12): 1092–9.
50. De Azevedo WF Jr (2010) Structure-based virtual screening. *Curr Drug Targets* 11(3): 261–3.
51. Wallace AC, Laskowski RA & Thornton JM (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 8(2): 127-34.

List of abbreviations:

PD: Parkinson's disease

IMAO: Inhibitor of Monoamine Oxidase

MAO: Monoamine Oxidase

MAO-A: Monoamine Oxidase A

MAO-B: Monoamine Oxidase B

FAD: Flavin –Adenine - Dinucleotide;

VS: Virtual Screening

2-BFI: 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline

RMSD: Root Mean Square Deviation

PDB: Protein Data Bank

EA: Evolutionary algorithm

PLP: Piecewise Linear Potencial

E intermol: energia intermolecular

E intramol: energia intramolecular

RO5: Lipinski's rule of five

ρ : Coeficiente de Spearman

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

IC50: half maximal inhibitory concentration

Figure Legends

Fig. 1 The crystal structure of human MAO-B. Structure of Monoamine Oxidase in complex with FAD and 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (PDB access code: 2XCG).

Fig. 2 Flowchart of virtual screening process.

Fig. 3 Search space sphere (green) defined for molecular docking simulations.

Fig. 4 Molecular structures of the top-scoring compounds identified in the VS protocol. A) ZINC02387301. B) ZINC00154386. C) ZINC02169849. D) ZINC00644889. E) ZINC00056610 F) ZINC02565373 G) ZINC01724292 H) ZINC00057128.

Fig.5 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline-binding pocket with main residues found in intermolecular interactions with 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline.

Table captions

Table 1 RMDS for all docking protocols implemented in the MVD program.

Table 2 Comparison of IC50 values for various derivatives of MAO-tested with interaction energy for docking experiment.

Table 3 Physical-chemical properties of ligands that fitted the Lipinski's rule of five after analysis by FAF-Drugs.

Table 4 Intermolecular interactions for the top-scoring ligands selected in the VS procedure. The presence of an X indicates that the interaction occurs. HB means hydrogen bonds and VDW means van der Waals contacts.

Figure 1

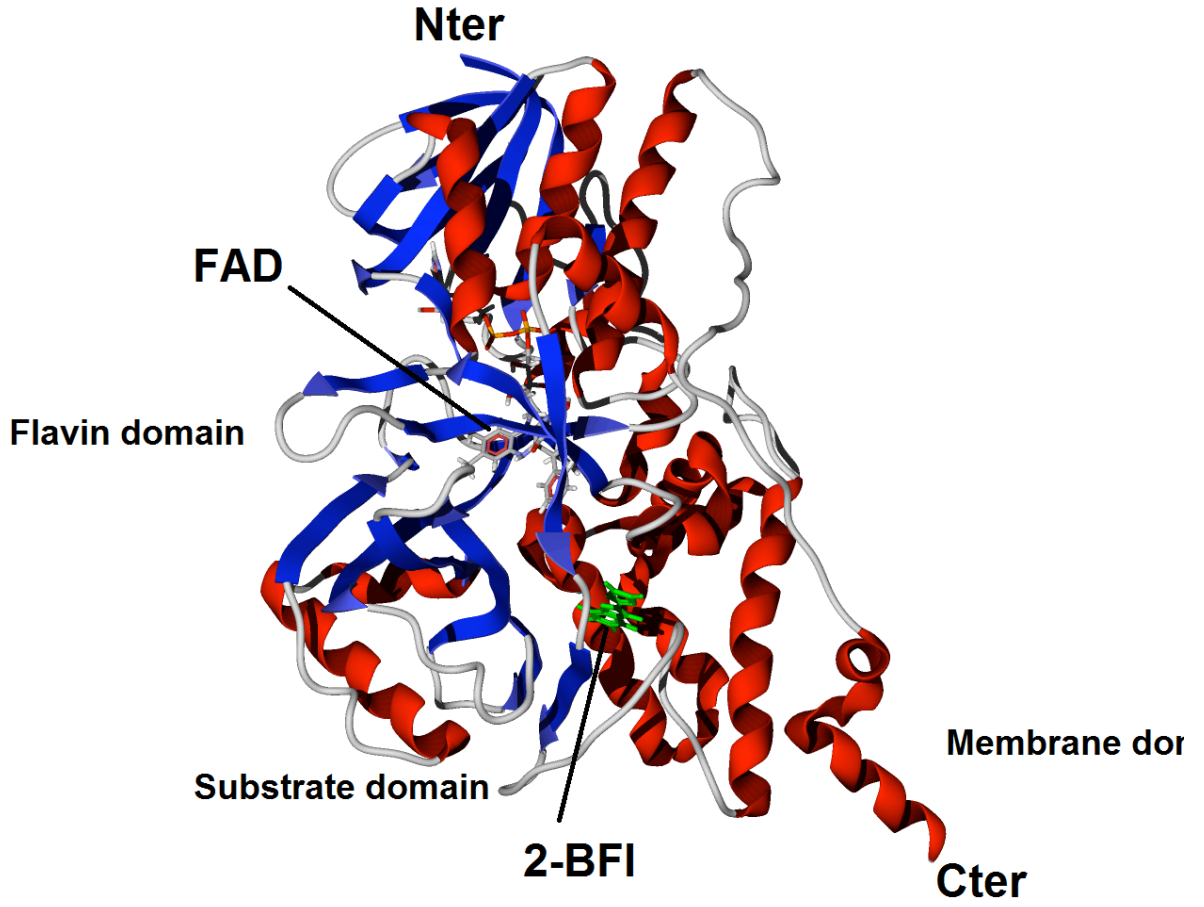


Figure 2

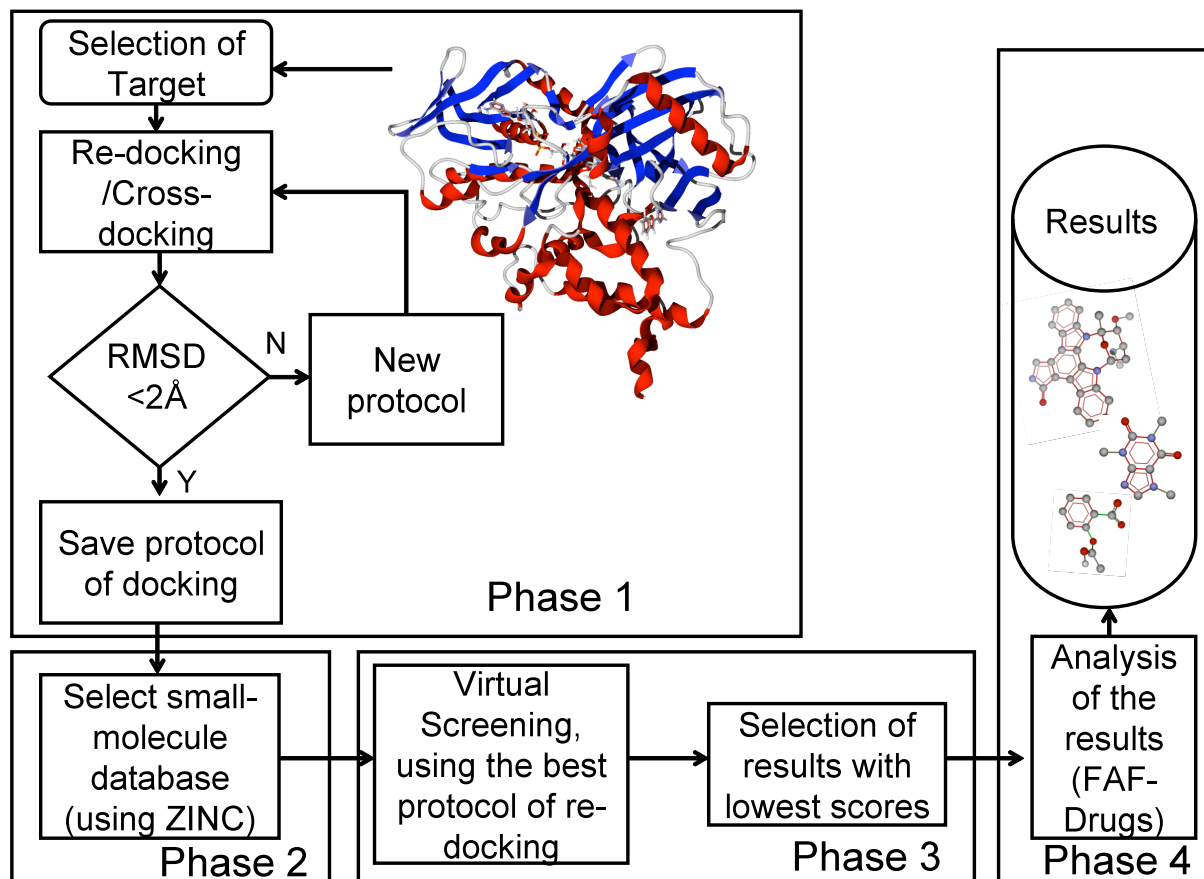


Figure 3

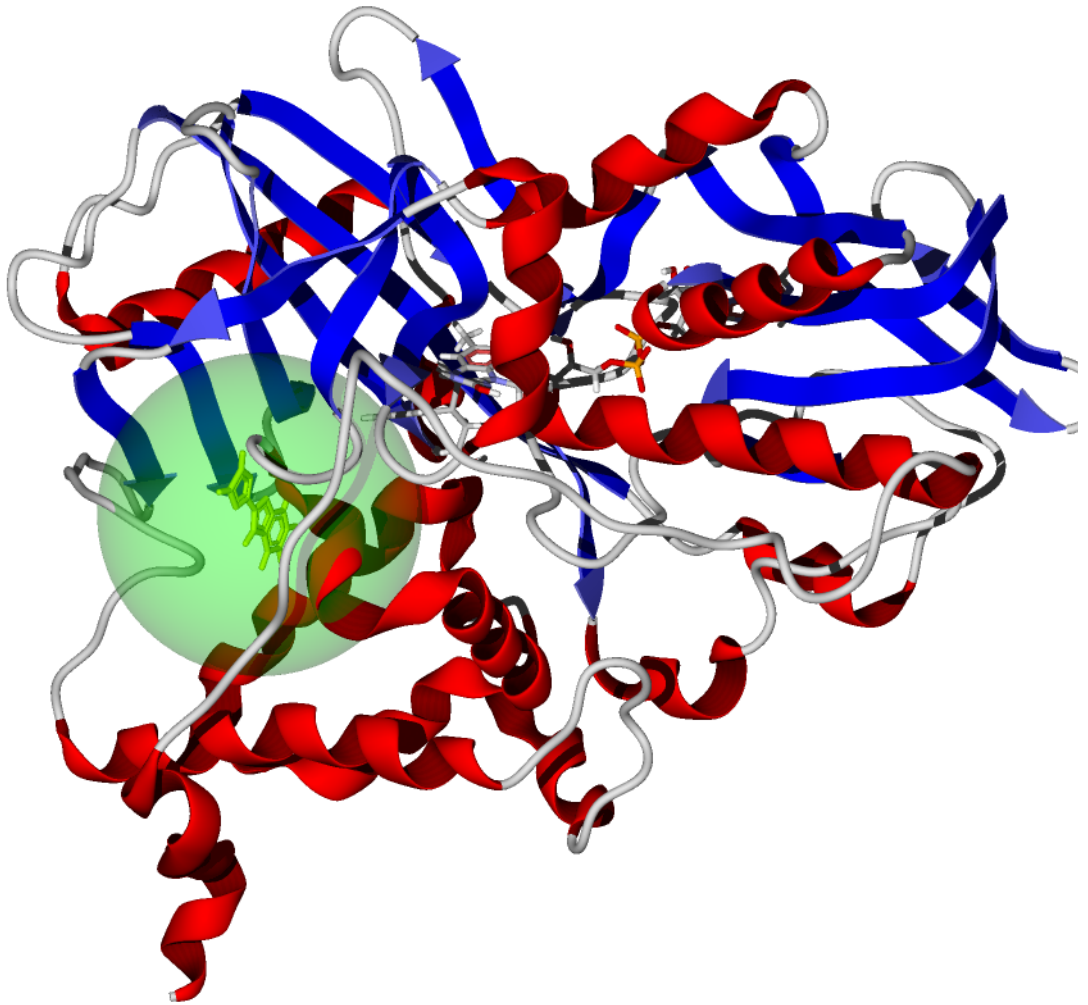


Figure 4A

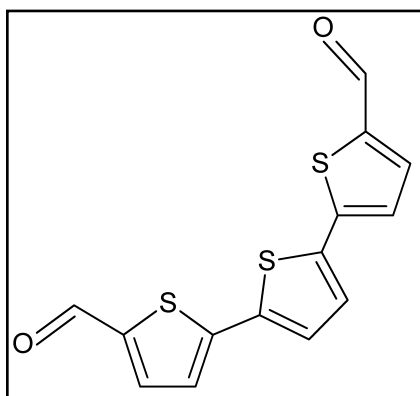


Figure 4B

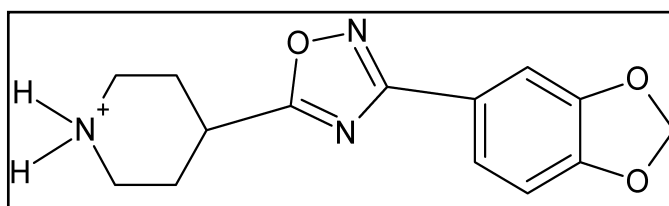


Figure 4C

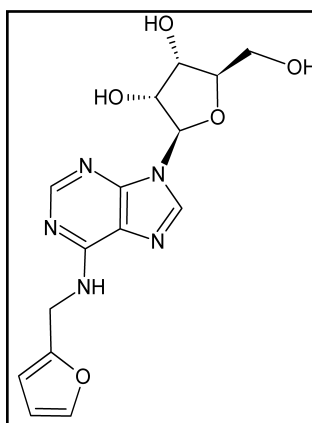


Figure 4D

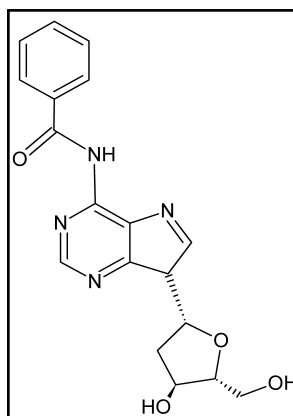


Figure 4E

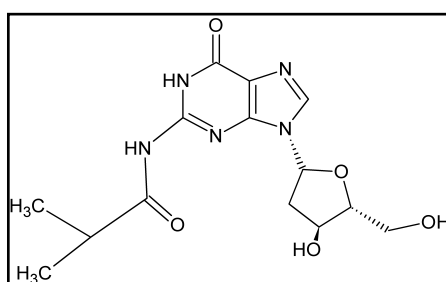


Figure 4F

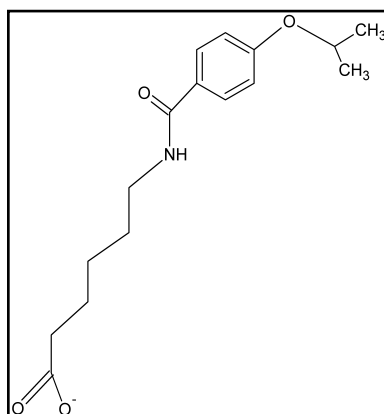


Figure G

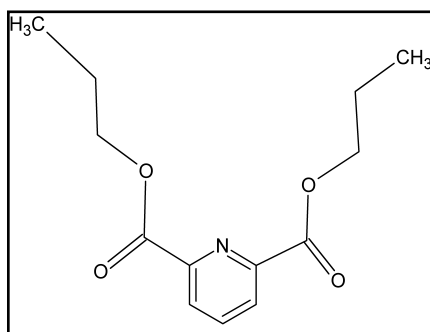


Figure 4H

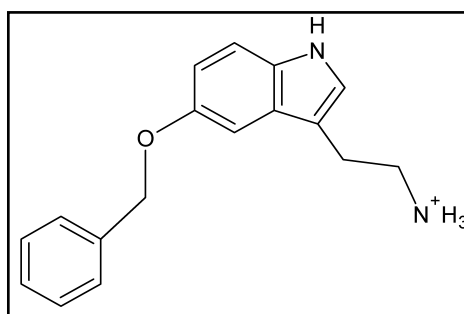


Figure 5

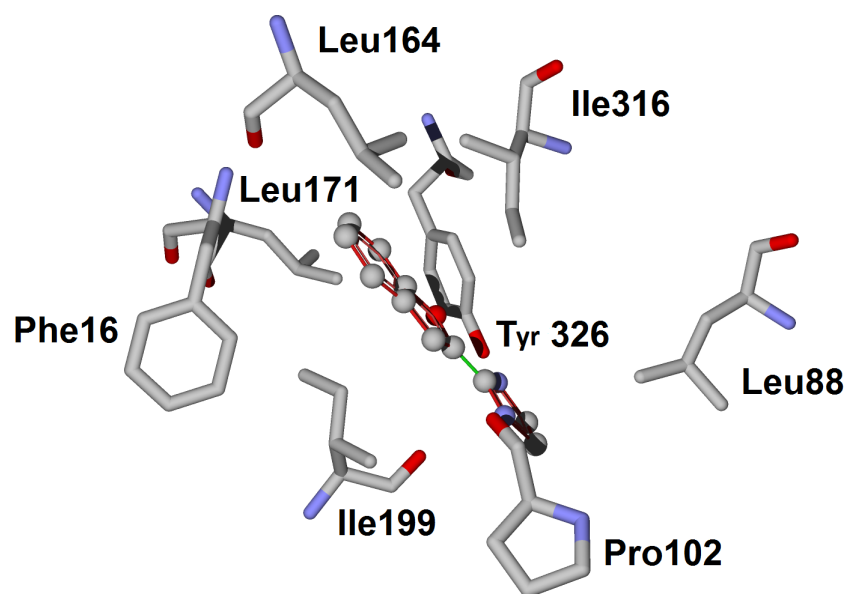


Table 1

Protocol	Scoring functions	Search algorithm	RMSD (Å)	RMSD (Å)	RMSD (Å)	RMSD (Å)
Sorting criteria			MolDock Score	Rerank Score	HBond	RMSD
1	MolDock Score	MolDock Optimizer	1.61	0.20	1.61	0.20
2	MolDock Score	MolDock (Simplex Evolution) SE	1.61	0.20	1.61	0.20
3	MolDock Score	Iterated Simplex	1.61	0.20	1.61	0.20
4	MolDock Score	Iterated Simplex (Ant Colony Optimization)	1.61	0.20	1.61	0.20
5	MolDock Score [GRID]	MolDock Optimizer	1.56	1.56	1.56	0.27
6	MolDock Score [GRID]	MolDock (Simplex Evolution) SE	12.08	12.08	12.08	11.54
7	MolDock Score [GRID]	Iterated Simplex	1.56	1.56	1.56	0.28
8	MolDock Score [GRID]	Iterated Simplex (Ant Colony Optimization)	1.56	1.56	1.56	0.27
Protocol	Scoring functions	Search algorithm	RMSD (Å)	RMSD (Å)	RMSD (Å)	RMSD (Å)
Sorting criteria			Plants Score	MolDock Score	Rerank Score	RMSD
9	PLANTS Score	MolDock Optimizer	1.60	1.60	0.23	0.23
10	PLANTS Score	MolDock (Simplex Evolution) SE	1.60	1.60	0.23	0.23
11	PLANTS Score	Iterated Simplex	1.60	1.60	0.23	0.23
12	PLANTS	Iterated	1.60	1.60	0.23	0.23

	Score	Simplex (Ant Colony Optimization)				
13	PLANTS Score [GRID]	MolDock Optimizer	1.54	1.54	0.21	0.21
14	PLANTS Score [GRID]	MolDock (Simplex Evolution) SE	1.54	1.54	0.21	0.21
15	PLANTS Score [GRID]	Iterated Simplex	1.54	1.54	0.21	0.21
16	PLANTS Score [GRID]	Iterated Simplex (Ant Colony Optimization)	1.54	1.54	0.21	0.21

Table 2

Ligante	Moldock Score	Rerank Score	H Bond	IC50	Log(IC50)
Clorgyline	-106,717	-85,5701	-1,6474	0,00042	-6,3767
cis-2,4,5- trimethoxypropenylbenzene	-84,506	-50,7948	0	0,362	-3,4412
Eugenol Methyl Ether	-78,6633	-66,0726	0	0,269	-3,57024
Deprenyl	-69,503	-23,0131	0	0,0023	-5,6382
Isatin	-60,6128	-51,2535	-2,5	0,008566	-5,0672
Eugenol	-58,33	-11,279	-2.499	0,288	-3,5406
			-		
(1S,2S)-(+)-psi-ephedrine	-56,2415	-28,2115	3,42698	234	-0,6307
O-eugenol	-53,8414	-19,5025	-0,9745	0,5	-3,301
4-Hydroxy-3- methoxybenzylamine	-53,6122	729.994	2,49674	0,382	-3,4179
(1R,2R)-(+)-psi-ephedrine	-50,0494	12,047	-2,5	88	-1,0555
2-(aminooxy)-1-phenylethanol	-48,1304	-14,2979	-1,9337	0,25	-3,602
2,6-dimethoxyphenol	-46,6543	-9,57545	-0,6459	0,5	-3,301
2-methoxyphenol	-45,5002	-37,1172	-6,0724	0,5	-3,301

Table 3

Ligand	ZINC Code	Molecular Weight (Da)	Number of HB acceptors	Number of HB donors	XLogP
1	2387301	304.4	2	0	4
2	154386	274.2	3	1	1,8
3	2169849	347.3	5	4	0,2
4	644889	355.3	4	3	0,2
5	56610	337.3	5	4	-0,1
6	2565373	292.3	4	1	3,2
7	1724292	279.3	5	0	3,7
8	57128	267.3	1	2	2

Table 4

Resíduos	Ligantes				
	HB	ZINC02387301	ZINC00154386	ZINC02169849	ZINC00644889
Ser200	X	X			X
Tyr326	X	X		X	
Ala325	X				
Pro102		X			
Thr201				X	
Glu84				X	X
Gln206				X	
Gly101					
Leu164					
VDW					
Pro102	X				X
Phe168	X			X	X
Ile316	X	X		X	X
Ile199	X	X		X	X
Leu167	X	X		X	X
Leu171	X			X	X
Leu88	X	X		X	X
Gly101		X			X
Phe103		X		X	
Trp119		X			
Thr201		X			
Ser200				X	
Pro104				X	
Thr314				X	X
Tyr326					X
Leu164					
Glu84					
Ala325					
Leu345					

Resíduos	Ligantes			
HB	ZINC00056610	ZINC02565373	ZINC01724292	ZINC00057128
Thr202				
Ser200	X			
Tyr326			X	
Ala325				X
Pro102				
Thr201	X	X		
Glu84	X			
Gln206				
Gly101	X			
Leu164				X
VDW				
Pro102		X	X	X
Phe168		X		X
Ile316	X	X	X	X
Ile199	X	X	X	X
Leu167			X	X
Leu171		X	X	X
Leu88	X	X	X	X
Gly101		X	X	
Phe103	X	X	X	X
Trp119				
Thr201				X
Ser200		X	X	X
Pro104	X		X	
Thr314				
Tyr326	X			
Leu164	X	X		
Glu84		X		X
Ala325			X	
Leu345			X	
Thr202		X		

Submission Confirmation

[Journal of Molecular Modeling](#) para "walter F de azevedo" <walter@azevedolab.net> (Out 10, 19:57) [Exibir detalhes](#)

De: "[Journal of Molecular Modeling](#)" <jmolmod@chemie.uni-erlangen.de> [Ocultar](#)

[detalhes](#) Para: "walter F de azevedo" <walter@azevedolab.net> [Data](#): Seg, Out 10, 2011, 19:57

Dear Walter,

Thank you for submitting your manuscript entitled: "Targeting imidazoline site on monoamine oxidase B through molecular docking simulations to the Journal of Molecular Modeling.

The manuscript number will be sent to you after your submission has been assigned to the Editor.

If your manuscript is accepted for publication in Journal of Molecular Modeling, you may elect to submit it to the Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>

If you have any questions, please do not hesitate to contact us.

If you have any questions, please do not hesitate to contact us.

Kind regards,

Editorial Office
Springer
P.O. Box 990
3300 AZ DORDRECHT
The Netherlands

Anexo B

Recent progress of molecular docking simulations applied to development of drugs

Linus Santana Azevedo, Fernanda Pretto Moraes, Mariana Morrone Xavier, Eduarda Ozório Pantoja, Bianca Villavicencio, Jana Aline Finck, Audrey Menegaz Proença, Kelen Beiestorf Rocha, Walter Filgueira de Azevedo Jr

Artigo aceito para publicação - *Current Bioinformatics*

Recent progress of molecular docking simulations applied to development of drugs

Linus Santana Azevedo^a, Fernanda Pretto Moraes^{b, c}, Mariana Morrone Xavier^c, Eduarda Ozório Pantoja^c, Bianca Villavicencio^c, Jana Aline Finck^c, Audrey Menegaz Proença^c, Kelen Beiestorf Rocha^{d, e}, Walter Filgueira de Azevedo Jr.^{,b,c,d*}

^a Colégio Anchieta - Associação Antônio Vieira. Av. Nilo Peçanha, 1521 - Bairro Três Figueiras - CEP: 91330-000 - Porto Alegre – RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.

^cFaculdade de Biociências, Laboratório de Bioquímica Estrutural. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, CEP 90619-900, Porto Alegre – RS, Brazil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil.

^eUniversidade Federal do Rio Grande, FAMED. Rua Visconde de Paranaguá, 102. Centro. 96200-190 - Rio Grande, RS - Brazil

LSA, FPM, MMX, EOP contributed equally to this article

*Corresponding author:

Walter Filgueira de Azevedo Jr.

Faculdade de Biociências, Laboratório de Bioquímica Estrutural, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 6681, CEP 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail: walter@azevedolab.net

Telephone: +55 51 3353-4529

Fax: +55 51 3320-3629

<http://azevedolab.net>

Abstract

In order to obtain structural information about intermolecular interactions between a protein target and a drug we could either solve the structure by experimental techniques (protein crystallography or nuclear magnetic resonance), or simulate the protein-drug complex computationally. Molecular docking is a computer simulation methodology that can predict the conformation of a protein-drug complex, with relatively high accuracy when compared with experimental structures. Although a plethora of algorithms has been applied to the problem of molecular docking simulation, recent results show that the most successful approaches are those based on evolutionary algorithms. Evolution as a source of inspiration has been shown to have a great positive impact on the progress of new computational methodologies. In this scenario, analyses of the interactions between a protein target and a drug can be simulated by these evolutionary algorithms. These algorithms mimic evolution to create new paradigms for computation. This review provides a description of evolutionary algorithms and applications to molecular docking simulation. Special attention is dedicated to differential evolutionary algorithm and its implementation in the program molegro virtual docker. Recent applications of these methodologies to protein targets such as acetylcholinesterase, cyclin-dependent kinase 2, purine nucleoside phosphorylase, and shikimate kinase are described.

Keywords: Evolutionary algorithms, differential evolution, molecular docking, structure-based virtual screening, protein-drug.

Introduction

Molecular docking simulation (MDS) is a computational methodology that provides automatic means to determine the conformation of a proteins-ligand complex. Although computational methods for protein-protein and DNA-protein docking simulations have been undergoing rapid development in the last decades, the focus of the present review is exclusively on protein-ligand docking simulations. For recent results about these macromolecular docking simulations see [1-4]. Considering protein-ligand interactions, it is possible to visualize that this computer simulation is equivalent to the key-and-lock problem, where the lock is the protein and the key the ligand. The main objective of the MDS is to adjust the position of the ligand (key) in the protein (lock). In a typical MDS it is generated many potential positions for the ligand in the protein. Consequently, it is necessary to have a model, which will allow evaluation of all several possible positions for the ligand, and then choose the best position. This model of selection could be expressed as an energy function [5] or a scoring function [6-11] not necessarily related to an energy function. Most of the times, these terms (scoring function and energy function) are regarded as being synonymous with each other. In addition to these two forms of evaluating protein-ligand interactions, there are three other methods: knowledge-based scoring functions [12-15], consensus scoring [16-19] and clustering-based scoring methods [20-22]. These methods have been recently reviewed [23] and will not be considered in the present review.

From the computational view, molecular docking can be seen as an optimization problem, where it is desired to find the best solution (right position for the ligand) from a set of possible positions [24]. Another classical example of optimization problem is the travelling salesman problem. In this problem we have to find the shortest tour around a number of cities, where we have an equation for calculation of the length of the tour. The desired output property is optimality, that is, minimal length. The major difficulty in the simulation of a protein-ligand complex is in part due to the fact that it involves many degrees of freedom. Combination of rotation and translation of one molecule relative to another involves six degrees of freedom. In addition, we have also torsion angles for both, protein and ligand [25-27]. The inclusion of solvent molecules or ions may also play an important role in the simulation and CPU time.

MDSs often make use of one or more of the following computational methodologies: Monte Carlo (MC) [28], Lamarckian genetic algorithm (LGA)[29, 30], fast shape matching (SM) [31], incremental construction (IC) [32, 33], distance geometry (DG) [34], simulated

annealing (SA) [35, 36] and tabu search (TS) [37]. All these computational methodologies have been recently reviewed [24]. Although intense research has been carried out on the application of the above mentioned algorithms to the problem of MDSs, recent results strongly indicate that the most successful approaches are those based on evolutionary algorithms (EAs) [26]. EAs can be employed to carry out protein-ligand docking [38-44]. In these algorithms each chromosome in a population encodes one conformation of the ligand and its orientation in the protein-binding pocket. A scoring function (also known as fitness function) is employed to assess the fitness of each individual of the population. This fitness function is used to select the members of the population, which will be kept in the next iteration. The process is repeated until a termination condition is reached. Among the plethora of computational methods classified as EAs, one has been shown to be particularly well-suited for MDS [45,46], this method is known as differential evolution algorithm (DEA). This revolutionary algorithm was first described in a publication in 1997 [47]. In this breakthrough paper, it was introduced the algorithm of differential evolution to a significant worldwide community and demonstrated the advantages of DEA over the other global optimization methods. Excellent results had been shown on an ample diversity of benchmarks and applications [45-47], including MDS [48].

DEA is an optimization methodology. And without regard to its simplicity DEA is one of the most influential algorithms for global optimization [45, 46]. DEA shares a lot in common with genetic algorithms (GAs), evolution strategies, or evolutionary programming. These are three basic computational methodologies of evolutionary optimization, also well known under the common term of evolutionary algorithms (EAs). Recently, with the introduction of new methods in optimization, including DEA, these methodologies have been named as artificial evolution. DEA belongs to this class of computational methodology [47, 48]. In addition, as we can figure out from the names, famous GAs is derived from the genetic evolution of chromosomes, ant colony optimization is guided by the study of ants' behavior, neural network is based on the model of neurons and their connections, and so on. On the contrary to all, DEA was derived from naturally mathematical (geometrical) influence [47, 48].

Under the light of EAs, MDS is a computational problem that may benefit from such evolutionary computing approaches. In MDSs, the major objective is to discover the best solution (pose) using fitness function (scoring or energy function). Darwin's theory of evolution states that groups of organisms will experience genetic changes over time due to the course of natural selection. Furthermore, Darwin's theory says that organisms which are most

fit for their environment continue to exist while unsuitable organisms die, altering the genetics of a species until that species is well adapted for its environment. In summary, Darwin's theory of evolution states that biological systems evolved to find the fittest solution to complex biological challenges. Therefore evolutionary ideas showed promising results in optimization problems, such as the molecular docking problem [49]. The present review brings together recent applications of EAs to MDSs. Our focus is on the state-of-art docking program Molegro virtual docker (MVD) [49, 50]. This program is an implementation of four search algorithms to find ligand position and orientation. They are: MOLDOCK optimizer (implementation of DEA), MOLDOCK simplex evolution (implementation of downhill simplex method), iterated simplex, and iterated simplex (with ant colony optimization). Our focus here is on the discussion of the first two algorithms, since they have been extensively applied to several MDSs with interesting results [49-90]. Furthermore, implementation MOLDOCK optimizer in the program MVD has been shown to be faster and more reliable than implementations of Monte Carlo simulated annealing (SA) method and the Lamarckian genetic algorithm (LGA) present in older molecular docking programs, such as AUTODOCK [50, 55].

Molecular docking simulations (MDSs)

The goal of any MDS is to predict the three-dimensional structure formed when one or more molecules form an intermolecular complex. A large number of programs have been developed for protein-ligand docking. For the authors of the present paper, the most important molecular docking programs are: ARGUSLAB [91, 92], AUTODOCK [29, 30], DOCK [93], FLEXX [32, 33], GEMDOCK [94-95], GLIDE [96-100], GOLD [101, 102], MVD [48], and SURFLEX [103]. Nevertheless, this list of programs could vary from author to author, but most users of MDS would agree with at least two of the previously mentioned programs: AUTODOCK [29, 30] and DOCK [93]. All these programs are implementations of algorithms developed with the purpose of obtaining a fast computational method capable to identify a novel lead compound (in virtual screening projects). In addition, these programs can be used to replicate experimental crystallographic structures (for validation with experimental data) at higher accuracy as possible. In a MDS, these programs can search for best fit between two or more molecules taking into account several intermolecular interaction parameters, obtained from receptor and ligand atomic coordinates such as: atomic VDW radius, charge, geometrical complementarity, hydrophobic contacts, intermolecular hydrogen bonds, and

torsion angles [50]. As a result MDS returns the predicted orientations (poses) of a ligand in the target's binding site. Usually the posing procedure returns several potential conformations and numerous positions for a key. Fitness functions (scoring or energy functions), which are able to assess binding free energy or intermolecular binding affinity, are employed with the aim of optimizing and categorizing results, obtaining the best orientation after the MDS, to choose the best key position [11].

There are essentially two major components of the MDS. First, we need an algorithm for exploring the space of possible protein-ligand geometries (poses), a search algorithm. Second, we need to evaluate and rank these poses in order to find the best binding mode for each ligand [27], so we need to apply scoring or energy functions to the poses. In MDSs the best binary complex (protein target + ligand) is the one closer to the experimental structure. For that reason, we have to establish a procedure to measure the distance from the computer generated solution (pose) to the experimental structure. Most of the times, these experimental structures are obtained by X-ray crystallography methods. This geometric distance can be calculated using root mean square deviation (RMSD), which is a measure of the differences between values predicted by a model and the values really observed from the object being modeled or estimated (protein-ligand complex). In MDSs we expect that the best results generate RMSD values below 2.0 Å, when compared to crystallographic structures [96]. This method of obtaining the crystallographic position of ligand is called “re-docking”, and it is basically a validation procedure to check whether the molecular docking algorithm is able to recuperate the crystallographic position by means of MDS. Usually, RMSDs calculations are performed for non-hydrogen atoms, since atomic positions for hydrogen atoms are not regularly identified in X-ray protein crystallography [104]. To identify hydrogen atoms positions it is necessary X-ray diffraction data at high resolution, better than 1.5 Å [104].

In addition to the re-docking, there is also a process called “cross-docking” that can be used to extend validation of a docking protocol. Considering that several crystallographic structures are available, for the same protein target, cross-docking can be applied. This procedure involves docking a number of ligands found in a variety of crystal structures of identical protein to a single rigid protein crystallographic conformation [105].

To illustrate the cross-docking simulation process let us consider the crystallographic structures of 3-dehydroquinate dehydratase (dehydroquinase) from *Mycobacterium tuberculosis* (MtDHQase), the third enzyme of the shikimate pathway [106]. There are crystallographic structures for the enzyme in complex with its reaction product, 3-dehydroshikimate, and with inhibitors (PDB access codes: 3N8N, 3N87, 3N7A, 3N76, 3N8K,

and 3N59). Application of guided differential evolution algorithm implemented in the program MVD (MOLDOCK optimizer) to this ensemble of structures generates RMSDs from 0.28 to 2.47 Å, which indicates that this docking algorithm is able to recover the crystallographic position with reasonable accuracy. Fig. 1 illustrates the crystallographic position and the pose for binary complex (MtDhQase and 2,3-anhydro-quinic acid) (PDB access code: 3N7A) [106].

In the next sections we will describe two major methods employed as search engine in the program MVD. Finally we have several sections with recent applications of MVD to the study of protein targets.

Downhill simplex method

Since we intend to reach a broader public in this review, we will briefly describe this computational method, which is well known for those who work with optimization methods. The downhill simplex method is also called the Nelder–Mead method [107]. The key concept to understand this algorithm is the simplex, which is a geometrical object consisting in N dimensions of $N+1$ points (or vertices) and all their interconnecting line segments, faces, and higher-dimension objects [108]. For instance, in the minimization of scoring functions with two independent variables the simplex object is a triangle, and for a scoring function with variables x, y, z the simplex object is a tetrahedron. The idea is to use a moving simplex in the search space to surround the optimal point and then minimize the simplex until its dimensions reach a particular error tolerance (tol), a termination condition. The allowed moves for a simplex are the following: reflection, reflection and expansion, contraction, and multiple contractions.

By moving the simplex in an appropriate succession, the minimum point can be found, surround it, and then shrink around it. The direction of a move is determined by the values the scoring function ($f(x)$) to be minimized at the vertices. The vertex with the highest scoring function is called HV and LV denotes the vertex with the lowest scoring function. The size of a move is restricted by the distance d measured from the HV to the centroid of the opposing face (in the case of the triangle, the middle of the opposing side).

The downhill simplex algorithm in pseudocode is the following [109]:

BEGIN

Generate simplex object;

WHILE ($d > tol$) DO


```

    Apply reflection to simplex object;
    IF (new simplex vertex <= previous LV) then;
        Accept reflection;
        Apply expanding the reflection;
        IF ( new simplex vertex <= previous LV ) then;
            Accept expansion;
        ELSE;
            Apply reflection again;
            IF (new simplex vertex < previous LV) then;
                Apply expansion;
                IF ( new vertex < previous HV) then;
                    Accept reflection;
                    Start next iteration;
                ELSE;
                    Apply contraction;
                    IF ( new vertex < HV ) then;
                        Accept contraction;
                        Start next iteration;
                    ELSE;
                        Apply shrinkage;
            OD
END

```

Implementation of this algorithm can be found in Python [109] and C++ [108]. Since, this algorithm requires several function evaluations it is not very efficient when compared with derivative methods [108]. It often works in problems where Powell's method hangs up, due to its robustness [109]. Nevertheless, this simple algorithm is able to solve complex optimization problems, such as in MDS. The program MVD has an option to use a modified version of the downhill simplex method as search engine [48].

Evolutionary algorithms (EAs)

The Darwin's theory of evolution plays a pivotal role in the understanding of biological evolution [49]. Although biological systems are most of the times difficult to

model, the basic concepts behind evolution are quite simple, and they can be seen as “the macroscopic view of evolution”, where natural selection is the most important one [110, 111]. The success of the theory of evolution gave the idea that their concepts could be used in other fields, for instance in the computing. Application of evolution concepts to computing gives rise to a class of algorithms called “evolutionary algorithms”.

Evolutionary algorithms (EAs) consist of a collection of computational methodologies derived from the ideas of Darwin’s theory of evolution. The main goal of these algorithms is to locate the most favorable solution for complex problems [112]. These algorithms are likely to locate the best or one of the best solution, but also they can be trapped in the local optimal solutions, incapable to locate the global best result. We can affirm that in EAs, the evolutionary course is simplified, and consequently it has not much in common with biological evolution. EAs are composed of a population of individuals (candidate solutions) submitted to random variation by means of variation operators, such as mutation and recombination (also known as crossover) [113]. The individual being altered is often referred to as the parent and the resulting solution after variation is called the offspring. Occasionally, more than one parent is employed to make the offspring by recombination of solutions, which is referred to as crossover. It is worth to mention that the EAs are stochastic. Thus, although during selection fitter individuals have a higher chance of being selected than less fit ones, typically even the weak individuals have a chance of becoming a parent or of surviving for the next iteration. During recombination process (crossover operator), the choice of which pieces from the parents will be recombined is made at random. The same random character is used in the mutation operator. The overall scheme for an EA [110] in pseudocode is shown below.

BEGIN

INITIALIZE population with random generated individuals;

EVALUATE fitness function for each individual;

WHILE (termination condition is NOT satisfied) DO

APPLY SELECTION OPERATOR to parents;

APPLY CROSSOVER OPERATOR to pairs of parents;

APPLY MUTATION OPERATOR to the resulting offspring;

EVALUATE all new candidates;

APPLY SELECTION OPERATOR to individuals for the next iteration;

OD

END

In order to explain the main ideas behind the EAs, let us consider one of the first EAs to be applied to MDSs, a genetic algorithm [111, 112]. GAs are perhaps the most common flavor of EAs. They were initially proposed by Holland [113]. This work has had an enormous impact in the progress of the discipline, to the point that some portions of it were considered nearly like dogmas (for instance use of binary strings as chromosomes). The major characteristic of GAs is the use of a recombination (or *crossover*) operator as the principal search engine [114]. A number of steps are implicated in a GA. At first, it is crucial to generate an initial population of configurations, which is called the initial “gene pool” of N possible solutions. Here this member of the gene pool (population) is known as a ‘chromosome’, which is frequently stored as a function of “0” and “1”. Initial gene pool is most directly generated by randomly setting bits to 0 or 1 in the chromosomes. After decoding each chromosome and assigning the proper values (integer, real or complex numbers), the fitness of each member of the population can be determined. This fitness function may be an internal potential energy function. Then we have to select some members of the gene pool to be parents for reproduction. The operator that can mix the genes of the two parents is called crossover, which reflects how genetics attributes are passed on. In order to create a true offspring, each of the parent chromosomes is cut into segments that are exchanged and attached together to generate the new chromosomes of the offspring. There is yet another operator, called mutation operator that carry out mutations on selected chromosomes. Subsequently it is permitted that a certain percentage of bits in the chromosome to mutate. This completes one cycle (iteration) of the GA. The new gene pool then becomes the current population ready for a new cycle [111]. The GA repeatedly applies this sequence for a predetermined number of iterations and/or until it converges.

To make the concepts easier to grasp, let us consider a classical numerical example. In this example we are going to find an integer x , that maximizes the square function (x^2). This integer is in the range from 0 to 4095. This is a kind of obvious problem, but we are going to use it to illustrate the GAs. In the implementation of this algorithm we have to use a binary string with the length of 12 ($111111111111_2 = 4095_{10}$). So we have to generate random numbers from 0 to 4095.

In this simple GA the selection operator will select the best half of the population, using the square function as fitness function (scoring function). After the initial population has been random generated, each individual (binary string is converted to a decimal) then square

function is calculated. We sort the half of the best individuals and then apply the crossover operator. The generated offspring will be then submitted to the mutation operator. We have a new population that will go to the next generation. A termination condition should be included here, to check whether this condition has been satisfied. A typical termination condition is the number of iterations (number of generations). Since we want only to highlight the basic aspects of the algorithm we will use the number of iterations as termination condition.

In the initialization, random numbers are generated to represent each chromosome in the population. Each line (binary string) is an individual. Now we calculate the fitness function ($f = x^2$) for each chromosome (selection). These binary strings can be converted to decimal and then we calculate the square function. We select the best half chromosomes in the population (gene pool).

In the following phase we have the crossover operator. Only the best parents are submitted to crossover. First the binary strings are random positioned and then a random crossover position is chosen. This crossover position indicates where the exchange of the chromosomes will take place, this position is called locus. The newly generated chromosomes are now part of the population together with the best parents.

Then we have the mutation operator, which is usually applied to a bit of the binary string, changing it from 0 to 1 or vice versa. Most applications of GAs suggest a probability of mutation (p_m) of approximately 0.001, ie for each one thousand bits one is to mutate. There are several possible implementations of this operator, one possibility is to apply it to a bit at position $1/p_m$, and generate a random number. If the random number is higher than 0.5, mutation occurs otherwise the bit is kept unchanged.

After application of the mutation operator the individuals (chromosomes) become the initial population of a new iteration. The cycle is repeated until a termination condition is reached. In the present implementation of the GA, we used the number of iterations (generations) as a termination condition. This pseudocode for this GA is shown below:

BEGIN

INITIALIZE population with random generated binary strings;

WHILE (termination condition is NOT satisfied) DO

CONVERT each binary string to a decimal number;

CALCULATE fitness function for each individual;

```
SELECT part of the population to go to the next generation (selection operator);  
GENERATE random numbers to select the parents to carry out crossover;  
PICK pairs of parent strings following the random order (crossover rate);  
CROSSOVER operator;  
MUTATION to the offspring;  
GENERATE a new population;  
  
OD  
END
```

This extremely simple genetic algorithm is implemented in the program esga0. The zipped file for source (ANSI C++) and executable (windows) can be downloaded at <http://azevedolab.dominiotemporario.com/doc/esga0.zip>. This program adds an option for multiple runs, where in each run new initial population is generated. This option allows avoiding fortuitous results, due to the stochastic character of GAs. In addition, plots can be generated to evaluate the behavior of maximum fitness function, average fitness function and maximum decimal number obtained for each iteration. Table 1 shows the results for the following input data:

```
Population size (max = 100): 20  
Maximum number of iterations (max = 100): 25  
Probability of crossover (suggested range [0.4, 0.9]) : 0.6  
Length of binary strings (max = 15): 12  
Probability of mutation (can't be zero): 0.09  
Number of runs (max = 10): 1
```

Analysis of the results in the table 1 indicates that after few iterations the maximum value for the fitness function is found. In this run the program converges after iteration 19. The multiple run option is present in several molecular docking programs, such as Molegro virtual docker [48].

Table 1. Results for application of GA after 25 iterations.

Iteration	Maximum decimal	Average fitness function	Maximum fitness function
1	4029	$6.87507 \cdot 10^{+06}$	16232841
2	4029	$1.02311 \cdot 10^{+07}$	16232841
3	4029	$1.20596 \cdot 10^{+07}$	16232841
4	4069	$1.38634 \cdot 10^{+07}$	16556761
5	4069	$1.44519 \cdot 10^{+07}$	16556761
6	4069	$1.49268 \cdot 10^{+07}$	16556761
7	4089	$1.5386 \cdot 10^{+07}$	16719921
8	4089	$1.53546 \cdot 10^{+07}$	16719921
9	4091	$1.57325 \cdot 10^{+07}$	16736281
10	4091	$1.59602 \cdot 10^{+07}$	16736281
11	4091	$1.58506 \cdot 10^{+07}$	16736281
12	4091	$1.57651 \cdot 10^{+07}$	16736281
13	4091	$1.58286 \cdot 10^{+07}$	16736281
14	4091	$1.65759 \cdot 10^{+07}$	16736281
15	4092	$1.59115 \cdot 10^{+07}$	16744464
16	4092	$1.62005 \cdot 10^{+07}$	16744464
17	4093	$1.59866 \cdot 10^{+07}$	16752649
18	4093	$1.63305 \cdot 10^{+07}$	16752649
19	4095	$1.59905 \cdot 10^{+07}$	16769025
20	4095	$1.65835 \cdot 10^{+07}$	16769025
21	4095	$1.60559 \cdot 10^{+07}$	16769025
22	4095	$1.66457 \cdot 10^{+07}$	16769025
23	4095	$1.59435 \cdot 10^{+07}$	16769025
24	4095	$1.63171 \cdot 10^{+07}$	16769025
25	4095	$1.599 \cdot 10^{+07}$	16769025

Molegro virtual docker (MVD)

MVD [48] is one of the available commercial programs for docking simulations based on EAs (simplex evolution and DEA). It is the focus of this review the implementation of EA in the program MVD, which seems to be one of the most successful MDS program. Recent evaluation of MVD indicates that it is capable of finding the right position of ligand. In addition, MVD shows superior overall performance when compared with AUTODOCK, SURFLEX, FLEXX and GOLD [48, 55].

In the implementation of EA in the MVD computational approximations of an evolution course called genetic operators, are applied to simulate the permanence of the most positive features. In a sample space, where there is a problem or a search routine and several dissimilar potential solutions (candidates), each alternative is ranked founded on a set of parameters (scoring function, or fitness function), and only the best ranked solutions are kept for the next iteration. This cycle is repeated until an optimal solution can be found, in the MDSs the optimal solution is the one with the best scoring function, which should be the closest to the crystallographic structure, when applied to the re-docking procedure.

The MVD presents two EAs to carry out position search in MDSs. One is called MOLDOCK simplex evolution (MOLDOCK SE), which is based on the downhill simplex method (Nelder-Mead algorithm). The simplex evolution algorithm implemented in the MVD carries out a combined local/global search on the poses generated by the pose generator. The local search is carried out by means of the Nelder-Mead local search algorithm [47] described above, but contrasting with Nelder-Mead's initial algorithm, this implementation has been modified to take the position of the other individuals in the population into account. In the simplex evolution implemented in the MVD, at each iteration a random generated individual is selected. The representation of this individual determines the first point of the simplex in the N-dimensional search space. Then N extra individuals are selected and their representations outline the remaining N points of the simplex (a simplex in N dimensions has N+1 points).

The second algorithm is called guided differential evolution algorithm (GDEA) also known as MOLDOCK optimizer [48]. Differential evolution algorithm (DEA) is possibly one of the hottest topics in today's EA research. DEA is a population-based stochastic method for global optimization. This algorithm is particularly successful for hard global optimization problem, as the one found in the molecular docking problem. GDEA is based on an EA adjustment called differential evolution (DE), which brings a distinct method to select and

modify candidate solutions (individuals). The main innovative inspiration in DEA is to generate offspring from a weighted difference of parent solutions. The DEA works as follows. In the first step, all individuals are initialized and evaluated in accordance with the scoring function (initialization). Afterward, the following process will be carried out if the termination condition is not met. For each individual in the population, an offspring is created by adding a weighted difference of the parent solutions, which are randomly chosen from the population. In the classical EAs no weighted differences are applied to generate offspring. Following that, the offspring replaces the parent, if and only if it is fitter. Otherwise, the parent survives and is passed on to the next generation (iteration of the algorithm). The termination condition is reached when the number of fitness (energy) evaluations performed exceeded the maximum number of evaluations allowed (max evaluations parameter setting). In addition, early termination was permitted if the variance of the population was below a certain threshold.

Furthermore, implementation GDEA in the MVD employs a cavity prediction algorithm to limit predicted conformations (poses) during the search procedure. Before starting the MDSs, all potential binding cavities can be located using the detect cavities option of the program MVD. More specifically, if a candidate solution is found outside the cavity, it is translated so that a randomly chosen ligand atom will be located within the region spanned by the cavity. If no cavities are found, the search process does not restrict the candidate solutions.

In application of GDEA to MDSs, only the ligand properties are represented in the individuals since the protein remains inflexible throughout the docking simulation. As a result a candidate solution is determined by a vector of real-valued numbers representing ligand position, orientation, and conformation as Cartesian coordinates for the ligand translation, four variables specifying the ligand orientation (encoded as a rotation vector and a rotation angle), and one angle for each flexible torsion angle in the ligand (if present). For each individual in the initial population, each of the three translational parameters (encoded as a position relative to the crystallographic native ligand) for x , y , and z is assigned an equably dispersed random number between -15.0 and 15.0 Å, which is added to the center of the crystallographic reference ligand. This procedure defines the docking sphere. Initializing the orientation is performed using Shoemake's methodology [115]. This algorithm is employed to create uniform random quaternions and converted these quaternions to their rotation axis/rotation angle representation. The flexible torsion angles (if present) are given a random angle ranging from -180° to $+180^\circ$. A torsion angle is calculated from the atomic coordinates of ligand.

MDSs usually use an energy-based scoring function to find the energetically most promising ligand conformation when bound to the protein target. The idea is that lower energy scores means better protein-ligand bindings compared to higher energy values. As a result, molecular docking can be formulated as an optimization problem, where the task is to find the ligand-binding mode with the lowest energy. Since precise methods to calculate ligand-binding energy are usually highly CPU-demanding tasks, application of fast empirical scoring functions should be preferred in MDSs. The empirical scoring function implemented MVD is derived from the piecewise linear potential (PLP) scoring functions [48]. The scoring function used by MVD improves these scoring functions with a new hydrogen bonding term and new charge schemes [48]. There are four scoring functions implemented in the latest version of MOLDOCK. They are: MOLDOCK score [48] and PLANTS score [116]. These two functions offer grid-based versions, in which hydrogen bond directionality is not considered. The grid-based scoring functions offer approximately 4 times speed up by performing a precalculation of potential-energy values on an equally spaced cubic grid. Recent reviews describe in detail these empirical scoring functions [11].

Recent applications

Several studies reported successful applications of MVD [49-90]. We describe here recent results focused on protein targets submitted to molecular docking using MVD. Most the applications of MVD to virtual screening (VS) projects follow four phases. Not every study using MVD goes through all phases, but at least three phases are present. Briefly, Phase 1 is focused on choice and corroboration of a docking protocol. MVD is used to recover the crystallographic position of a ligand in complex with a protein target (re-docking simulation). Phase 1 finishes when a satisfactory docking protocol is established (selection criterion $\text{RMSD} < 2.0 \text{ \AA}$). Further validation can be carried out using more than a complex protein-ligand, if it is available for the same protein. In this case it can be applied the same docking protocol to more than one structure. This process is called cross-docking. In addition, it is also possible to test whether the docking protocol is able to identify known inhibitors in a dataset of decoys which was enriched with these inhibitors. Then it is possible to calculate the enrichment factor (EF), which takes into account the improvement of the hit rate by a VS protocol compared to a random selection. EF is defined by the following equation,

$$EF = \frac{H_a/H_t}{A/N} ,$$

where H_a is the number of active compounds in the H_t top-ranked compounds of a total database of N compounds of which A are active [117, 118]. Successfully VS implies $EF \gg 1$.

In Phase 2, it is selected a small-molecule database to be employed in the VS. This database could have thousands or even millions of molecules. Nevertheless, it is also possible to have only one molecule in the dataset [55].

In phase 3, it is carried out docking simulations for each ligand present in the selected database. During a characteristic MDS numerous orientations can be found for each ligand. It is selected the one with the lowest scoring function. Four scoring functions are implemented in the MVD, including MOLDOCK score [48] and PLANTS score [116]. These two functions offer grid-based versions, in which hydrogen bond directionality is not considered. After identification of potential inhibitors by MDSs, the best scored ligands can be submitted to the web server FAF-Drugs [119], in order to assess physical-chemical properties (phase 4). These are key properties that need to be considered in early stages of the drug discovery process, and FAF-Drugs allows users to filter molecules via simple rules such as molecular weight, polar surface area, $\log P$ and number of rotatable bonds. The ligands can be filtered following the Lipinski's rule of five (RO5). RO5 advocates that drugs which present oral bioavailability, in general, follow: molecular weight less or equal to 500, $\log P$ less or equal to 5, number of hydrogen bond donor groups less or equal to 5 and number of hydrogen bond acceptor groups less or equal to 10 [120]. We have recently applied this methodology to an in silico study of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* [121].

Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7)

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease related to a low presence of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). ACh is hydrolyzed by acetylcholinesterase (AChE). As a result, inhibition of AChE has shown results in the treatment of AD. Furthermore, the physiological role of the AChE in neural transmission has been well known, therefore AChE is also a target for development of drugs to be employed in treatments of myasthenia gravis and glaucoma [55, 122, 123]. To discover new inhibitors of AChE, many studies have been focused on MDSs of large compound databases against crystallographic structures of AChE [55, 69, 72, 122]. For a recent review see [123].

A recent publication describes re-docking and cross-docking simulation of AChE using MVD [55]. In this work ten AChE complexes (PDB access codes: 1ACJ, 1ACL, 1DX6, 1E3Q, 1EVE, 1OCE, 1U65, 1VOT, 2ACE, and 2ACK) were submitted to MDSs in order to validate a molecular docking protocol to be used to identify the molecular-binding mode of the alkaloid geissospermine into the AChE.

In this study, prior to MDS, all atom types and the bond orders were corrected to both ligand and AChE structures using the MVD automatic preparation function [55]. For each binary complex, the hydrogen atoms were added and the MVD default charges were assigned. Molecular cavities were detected using the grid-based cavity prediction algorithm. The parameters used in all simulations for AChE are the following:

population size = 150,

maximum interactions = 2000,

scaling factor = 0.50, and

crossover rate = 0.90.

For each binary complex, it was carried out 100 independent runs with the MOLDOCK optimizer algorithm. The pose with the lowest scoring function were selected for each run. RMSDs for the superposition of poses and crystallographic positions for the ligands range from 0.51 to 4.91 Å [55]. Most of the results are below 2 Å. In addition, cross-docking simulations were also carried out for the same set of structures with AUTODOCK, with poorer results [55]. Fig. 2 shows the best MDS result for structure of AChE in complex with tacrine (PDB access code: 1ACJ) [124] obtained using the previously described docking protocol [55], with a reduction in the number of runs to 10. As we can see in the Fig. 2 the pose is close to the crystallographic structure, with an RMSD of 0.68 Å.

Cyclin-Dependent Kinase 2 (EC 2.7.1.37)

Cyclin-Dependent Kinase 2 is a well-established protein target for development of anti-cancer drugs [125-127]. This enzyme is involved in cell-cycle progression, and there are hundreds of crystallographic structures of CDK2 in complex with inhibitors [128], which opens the possibility of carrying out cross-docking validation for docking protocols. Table 2 shows the PDB access codes for 20 CDK2 structures in complex with different inhibitors. These structures were solved using X-ray crystallographic, and they all show clear electron density for the inhibitors bound to the ATP-binding pocket. Cross-docking simulations for

these structures were performed with MOLDOCK optimizer search engine and MOLDOCK scoring function.

For each CDK2-inhibitor complex, it was performed 10 independent runs with the MOLDOCK optimizer algorithm (GDEA). The results generated RMDS ranging from 0.43 to 2.04 Å. Most of the RMSDs are below 1.5 Å, 15 out of 20 complexes, and only one complex presents RMSD higher than 2.0 (PDB access code: 2VV9). The parameters used in all MDSs for CDK2 are the following:

population size = 50,

maximum interactions = 2000,

scaling factor = 0.50 and

crossover rate = 0.90 .

Fig. 3 shows the pose and the crystallographic structure of CDK2 in complex with the inhibitor staurosporine (PDB access code: 1AQ1) [129]. All compounds in the table 2 have experimental information for their inhibition activity (IC_{50}) retrieved from the BRENDA [130]. Therefore, we can test the ability of the MOLDOCK score to predict the inhibitory activity for these compounds. It is expected that scoring functions show a correlation with inhibitory activity (IC_{50}) (Table 2). To carry out comparisons we used pIC_{50} , which is the log (IC_{50}).

Table 2. MOLDOCK scores and pIC_{50} obtained for 20 complexes involving CDK2 and inhibitors.

PDB	MOLDOCK Score	RMSD (Å)	IC_{50} (nM)	$pIC_{50} = \text{Log}(IC_{50})$
2DUV	-140.878	1.44	87	-7.06048
1KE6	-149.129	1.42	5,7	-8.24413
1AQ1	-169.322	0.43	6,18	-8.20901
2VTT	-136.446	0.53	44	-7.35655
2W05	-164.902	1.57	2	-8.69897
2VV9	-144.493	2.04	17	-7.76955
2R3M	-147.197	0.56	10	-8
2BTR	-103.666	0.62	95	-7.02228
3IGG	-121.503	1.37	95	-7.02228
1G5S	-165.894	1.91	48	-7.31876
1VYZ	-103.625	0.75	290	-6.5376

1P2A	-138.834	0.47	12	-7.92082
1KE5	-130.629	0.75	560	-6.25181
2VTL	-86.1241	0.49	97000	-4.01323
2VTO	-123.507	0.54	140	-6.85387
1E1V	-104.58	1.22	17000	-4.76955
2VTI	-119.503	1.17	660	-6.18046
2A4L	-133.179	2	350,3	-6,45556
1DI8	-106.951	1.37	1000	-6
1KE9	-135.566	1.79	660	-6.18046

Since there is no direct significant relationship between the two datasets, we have to calculate the Spearman's rank order correlation coefficient to evaluate the statistical significance of the relationship between these two independent variables (MOLDOCK score and pIC_{50}). The equation for this correlation coefficient is as follows,

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{j=1}^N [r(x_j) - r(y_j)]^2}{N^3 - N}$$

where N is the number of pairs, 20 in our case, the variables $r(x_j)$ and $r(y_j)$ are the rank of the pIC_{50} and the MOLDOCK score of the jth sample in the dataset.

For this dataset (table 2) we obtained a correlation coefficient $\rho = 0.82$, which is higher than the critical value at the 0.005 level of significance (0.696). It implies that the MOLDOCK score of MVD can be applied for activity prediction. Furthermore, this result is much better than previously published results using AUTODOCK to predict IC_{50} for CDK2 inhibitors [131]. Application of MOLDOCK optimizer to CDK2 is able to recover the crystallographic position of a wide spectrum of chemical structures. Analysis of the intermolecular interaction of all poses indicates the participation of the Leu 83 and Glu 81 in these interactions, for all CDK2-inhibitor complexes. These residues have been identified as of pivotal importance for the structural basis for inhibition of CDK2 [131-134].

Purine Nucleoside Phosphorylase (EC 2.4.2.1)

Purine nucleoside phosphorylase (PNP) catalyzes the phosphorolysis of purine nucleosides to corresponding bases and sugar 1-phosphate. This enzyme plays a central role in purine metabolism, usually operating in the purine salvage pathway of cells. PNPs are found in the majority prokaryotic and eukaryotic organisms. PNPs can be classified into two classes based on their quaternary structure. Trimeric PNPs have a monomeric molecular weight around 31 kDa and are usually specific for 6-oxopurine nucleosides. Hexameric PNPs have a monomeric molecular weight of about 25 kDa and often accept both 6-oxo- and 6-aminopurine nucleosides [135-137].

PNPs have been studied extensively by X-ray crystallography and atomic coordinates for quite a few examples from each family are in the Protein Data Bank (PDB) [138-157]. We recently described the application of MDS to PNP from *Mycobacterium tuberculosis* [65]. In this study we used the default protocol of MVD (MOLDOCK SE as search engine and MOLDOCK score). Nevertheless, similar results were obtained using MOLDOCK optimizer as search engine. Application of the MVD to the three-dimension structure of MtPNP in complex with 2'-deoxyguanosine was capable of correctly predicting its positioning in the binding pocket of MtPNP. The parameters used in all MDSs for PNP are the following:

population size = 50,

maximum interactions = 2000,

scaling factor = 0.50 and

crossover rate = 0.90 .

Fig. 4 shows the superposition of the pose and crystallographic structure of 2'-deoxyguanosine, the RMSD of superposition of non-hydrogen atoms is 0.78 Å. In addition, in this study we also applied the same docking protocol to three previously solved structures of MtPNPs (PDB access codes: 1G2O, 1I80, and 1N3I), from 0.4 to 0.7 Å, which further validate the docking protocol. These altogether, strongly indicated MVD can be employed against any of these MtPNP structures. Virtual screening using MVD and POLSCORE scoring function was able to identify active inhibitors for PNP is a dataset with 581 molecules, which highlight the capability of this approach to identify inhibitors.

Shikimate kinase (EC 2.7.1.71)

Our group recently published a study focused on the fifth enzyme of the shikimate pathway, the shikimate kinase (SK) [121], which we briefly describe here. The main goal of this docking study was to find potential inhibitors against SK from *Mycobacterium tuberculosis* (MtSK) using VS. SK catalyzes the phosphorylation of the 3-hydroxy group of shikimate using ATP as a co-substrate resulting in shikimate-3-phosphate and ADP [158-160]. SK is an important protein target for development of anti-tubercular drugs [161]. The MOLDOCK optimizer was employed in this study for all MDSs. The docking protocol was validated against an ensemble of 12 crystallographic structures available for complexes of MtSK (PDB access codes: 2DFN, 1U8A, 1WE2, 1ZYU, 2G1K, 2IYQ, 2IYR, 2IYS, 2IYX, 2IYY, 2IYZ, and 3BAF). The parameters used in all MDSs for CDK2 are the following:

population size = 100,

maximum interactions = 2000,

scaling factor = 0.50 and

crossover rate = 0.90 .

Fig. 5 shows the shikimate-binding site with superposition of the pose and crystallographic structure for the shikimate, the RMSD of superposition of non-hydrogen atoms is 1.25 Å. Analysis of the MVD results was able to corroborate the importance of some shikimate-active site residues as responsible to establish intermolecular interactions with the substrate as well as with the tested ligands. The binding of shikimate to its cavity, presents pivotal residues that make protein-ligand interactions possible. The SK residues that perform intermolecular hydrogen bonds with the shikimate are: Gly80, Arg136 and Arg58. SK makes van der Waals contacts with residues: Ile45, Asp34, Pro11, Pro118, Gly79, Phe57, Leu119 and Gly81. Analysis of shikimate-binding site indicated that all top-scoring compounds, identified in the VS, present interaction with residues Lys15, Ser16 and Arg117. In addition, two previously published MDS studies focused on MtSK were able to identify intermolecular molecular interactions with the same residues [162, 163], further corroborating the pivotal importance of these residues for ligand-binding affinity. Especially interesting is the fact that these previous molecular docking studies analyzed completely different molecular moieties, such as dipeptides (arginine-aspartate/lysine-aspartate) [163] and triazole/tetrazole heteroaromatic systems [162].

Future works

Although MVD has been intensively used in VS projects in the last years [49-90], this methodology retains significant weaknesses [117-118]. An evidence to this feature is the small number of decoy studies with MVD [65, 121], where the success of a docking screen is evaluated by its ability to enrich the small number of known inhibitors in the top ranks of a screen from among a much greater number of decoy molecules in the database [117-118]. To overcome this deficiency, we have been working on the development of several datasets of decoys using MOLDOCK optimizer as docking engine. We are concerned about mounting benchmarking sets to assess docking screening calculations.

It is worth to mention that one interesting feature of MVD, is the template docking. Template docking can be applied when information about the 3D conformation of a ligand is available. For example, a protein presents one or more inhibitors with crystallographic structures. From the known conformations it is possible to generate a template with features expected to be important for the ligand binding. This allows the MOLDOCK optimizer (MOLDOCK score GRID as scoring function) (or any other docking search algorithm) to focus the search on poses related to the docking template. This resource has been not been used very often [84], but once applied it has shown overall docking performance better than FLEXX and GLIDE [84].

Final remarks

One of the most important results from the several applications of MVD is the comparison of re-docking simulations between MVD and other docking programs, such as GOLD, FLEXX, GLIDE, and AUTODOCK [48, 55, 84]. These comparisons strongly indicated that the MVD is able to obtain lower RMSDs in the great majority of the analyzed crystallographic structures. In addition, MVD not only presents a better overall performance in re-docking simulations, but it is also faster than AUTODOCK [55], one of the first MDS program. This is especially true when the GRID option of the MOLDOCK score is used to rank VS results. Furthermore, integration of MVD and a new generation empirical scoring functions (POLSCORE) [65], opens the possibility of testing a wide spectrum of empirical scoring functions, identifying the function that better represents the intermolecular interaction between the protein target and a selected data set of ligands. This was the case for PNP, where this integration was able to identify enzyme inhibitors present in a data set with decoys [65].

The continuing development of MVD, it is in the version 4.3 (September, 2011), the possibility of coarse-grain parallelization (Molegro virtual grid creates an infrastructure for distributing docking runs on multiple processors), makes clear that we should expect increasing participation of this program in virtual screening projects and a slowly substitution of older and antiquate molecular docking programs such as AUTODOCK.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Ministério de Ciência e Tecnologia (INCT-Tuberculose, CNPq-MCT, Brazil). WFA is senior researcher for CNPq (Brazil). The fellowships from CNPq-Brazil and BPA/PUCRS(Brazil) are also acknowledged (FPM, MMX, KBR, BV and EOP).

Abbreviations

ACh = Acetylcholine

AChE = Acetylcholinesterase

CDK2 = Cyclin-Dependent Kinase 2

DEA = Differential evolution algorithm

DG = Distance geometry

EA = Evolutionary algorithm

GA = Genetic algorithm

GDEA = Guided differential evolution algorithm

IC = Incremental construction

IC₅₀ = Inhibition activity at 50 % (IC₅₀). IC₅₀ is a measure of the effectiveness of a molecule in inhibiting biological or biochemical function.

LGA = Lamarckian genetic algorithm

MC = Monte Carlo

MDS = Molecular docking simulation

PDB = Protein data bank

PLP = Piecewise linear potential

PNP = Purine nucleoside phosphorylase

RMSD = Root mean square deviation

RO5 = Lipinski's rule of five

SA = Simulated annealing

SK = Shikimate kinase

SM = shape matching (SM)

VDW = van der Waals

VS = Virtual screening

TS = Tabu search

References

- [1] Zacharias M. Accounting for conformational changes during protein-protein docking. *Curr Opin Struct Biol* 2010; 20(2): 180-6.
- [2] Vajda S, Kozakov D. Convergence and combination of methods in protein-protein docking. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19(2): 164-70.
- [3] Andrusier N, Mashiach E, Nussinov R, *et al.* Principles of flexible protein-protein docking. *Proteins* 2008; 73(2): 271-89.
- [4] Gao M, Skolnick J. From nonspecific DNA-protein encounter complexes to the prediction of DNA-protein interactions. *PLoS Comput Biol* 2009;5(3):e1000341.
- [5] Klebe G, Böhm HJ. Energetic and entropic factors determining binding affinity in protein-ligand complexes. *J Recept Signal Transduct Res* 1997;17(1-3):459-73.
- [6] Böhm HJ. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des* 1994;8(3):243-56.
- [7] Böhm HJ. Current computational tools for de novo ligand design. *Curr Opin Biotechnol* 1996; 7(4):433-6.
- [8] Böhm HJ. Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. *J Comput Aided Mol Des* 1998;12(4):309-23.
- [9] Stahl M, Böhm HJ. Development of filter functions for protein-ligand docking. *J Mol Graph Model.* 1998;16(3):121-32.
- [10] Wang R, Lai L, Wang S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des* 2002;16(1):11-26.
- [11] De Azevedo Jr. WF, Dias R. Computational methods for calculation ligand-binding affinity. *Curr Drug Targets* 2008; 9:1031-9.
- [12] Verkhivker G, Appelt K, Freer ST, *et al.* Empirical free energy calculations of ligand-protein crystallographic complexes. I. Knowledge-based ligand-protein interaction potentials applied to the prediction of human immunodeficiency virus 1 protease binding affinity. *Protein Eng* 1995; 8: 677-91.
- [13] Huang S-Y, Zou X. Mean-force scoring functions for protein-ligand binding. *Annu Rep Comput Chem* 2010; 6: 281-96.

- [14] Koppensteiner WA, Sippl MJ. Knowledge-based potentials – Back to the roots. *Biochemistry (Moscow)* 1998; 63: 247-52.
- [15] Thomas PD, Dill KA. Statistical potentials extracted from protein structures: How accurate are they? *J Mol Biol* 1996; 257: 457-69.
- [16] Charifson PS, Corkery JJ, Murcko MA, *et al.* Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J Med Chem* 1999; 42: 5100-9.
- [17] Wang R, Wang S. How does consensus scoring work for virtual library screening? An idealized computer experiment. *J Chem Inf Comput Sci* 2001; 41: 1422-6.
- [18] Clark RD, Strizhev A, Leonard JM, *et al.* Consensus scoring for ligand/protein interactions. *J Mol Graph Model* 2002; 20: 281-95.
- [19] Terp GE, Johansen BE, Christensen IT, *et al.* A new concept for multidimensional selection of ligand conformations (MultiSelect) and multidimensional scoring (MultiScore) of protein-ligand binding affinities. *J Med Chem* 2001; 44: 2333-43.
- [20] Ruvinsky AM. Calculations of protein-ligand binding entropy of relative and overall molecular motions. *J Comput.-Aided Mol Des* 2007; 21: 361-70.
- [21] Chang MW, Belew RK, Carroll KS, *et al.* Empirical entropic contributions in computational docking: Evaluation in APS reductase complexes. *J Comput Chem* 2008; 29: 1753-61.
- [22] Lee J, Seok C. A statistical rescoring scheme for protein-ligand docking: Consideration of entropic effect. *Proteins* 2008; 70: 1074-83.
- [23] Huang SY, Zou X. Advances and challenges in protein-ligand docking. *Int J Mol Sci* 2010; 11(8): 3016-34.
- [24] Dias R, De Azevedo Jr. WF. Molecular docking algorithms. *Curr Drug Targets*, 2008; 9:1040-7.
- [25] Bellows ML, Floudas CA. Computational methods for de novo protein design and its applications to the human immunodeficiency virus 1, purine nucleoside phosphorylase, ubiquitin specific protease 7, and histone demethylases. *Curr. Drug Targets* 2010; 11:264-78.
- [26] De Azevedo Jr. WF. MolDock Applied to Structure-Based Virtual Screening. *Curr. Drug Targets* 2010; 11: 327-34.
- [27] Leach AR. *Molecular Modelling. Principles and Applications*, 2nd ed. Essex: Pearson Prentice Hall 2001.

- [28] Liu M, Wang S. MCDOCK: a Monte Carlo simulation approach to the molecular docking problem. *J Comput Aided Mol Des* 1999; 13: 435-51.
- [29] Rosenfeld RJ, Goodsell DS, Musah RA, *et al.* Automated docking of ligands to an artificial active site: augmenting crystallographic analysis with computer modeling. *J Comput Aided Mol Des* 2003; 17: 525-36.
- [30] Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit* 1996; 9: 1-5.
- [31] Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, *et al.* A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol* 1982; 161: 269-88.
- [32] Rarey M, Kramer B, Lengauer T, *et al.* A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* 1996; 261: 470-89.
- [33] Kramer B, Rarey M, Lengauer T. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins* 1999; 37: 228-41.
- [34] Moré JJ, Wu Z. Distance geometry optimization for protein structures *J Global Optim* 1999; 15: 219-34.
- [35] Kirkpatrick S, Gelatt CD, Vecchi MP. Optimization by simulated annealing. *Science* 1983; 220: 671-80.
- [36] Goodsell DS, Olson AJ. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins-Struct Funct Genet* 1990; 8: 195-202.
- [37] Baxter CA, Murray CW, Clark DE, *et al.* *Proteins*, 1998; 33: 367-82.
- [38] Judson RS, Jaeger EP, Treasurywala AM. A genetic algorithm-based method for docking flexible molecules. *J Mol Struc: Theochem* 1994; 114: 191-206.
- [39] Jones G, Willett P, Glen RC. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol* 1995;245(1): 43-53.
- [40] Jones G, Willett P, Glen RC. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J Comput Aided Mol Des* 1995;9(6): 532-49.
- [41] Jones G, Willett P, Glen RC, *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 1997; 267(3): 727-48.
- [42] Oshiro CM, Kuntz ID, Dixon JS. Flexible ligand docking using a genetic algorithm. *J Comput Aided Mol Des* 1995; 9(2): 113-30.
- [43] Moitessier N, Englebienne P, Lee D, *et al.* Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *Br J Pharmacol*. 2008;153 Suppl 1: S7-26.

- [44] Gehlhaar DK, Verkhivker GM, Rejto PA, *et al.* Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. *Chem Biol*; 2(5): 317-24.
- [45] Feoktistov V. Differential evolution. In search of solutions. New York: Springer Science+Business Media LLC 2006.
- [46] Chakraborty UK, Ed. Advances in differential evolution. Heidelberg: Springer-Verlag 2008.
- [47] Storn R, Price K. Differential evolution – A simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces. *J Global Optim* 1997; 11(4):341-59.
- [48] Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 2006; 49: 3315-21.
- [49] Darwin C. The origin of Species. London: John Murray 1859.
- [50] Heberlé G, De Azevedo Jr. WF. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. *Curr Med Chem* 2011; 18(9): 1339-52.
- [51] Zaheer-ul-Haq, Khan W. Molecular and structural determinants of adamantyl susceptibility to HLA-DRs allelic variants: an in silico approach to understand the mechanism of MLEs. *J Comput Aided Mol Des* 2011; 25(1): 81-101.
- [52] Plazuk D, Zakrzewski J, Salmain M. Biotin as acylating agent in the Friedel-Crafts reaction. Avidin affinity of biotinyl derivatives of ferrocene, ruthenocene and pyrene and fluorescence properties of 1-biotinylpyrene. *Org Biomol Chem* 2011; 9: 408-17.
- [53] Seal A, Aykkal R, Babu RO, *et al.* Docking study of HIV-1 reverse transcriptase with phytochemicals. *Bioinformation* 2011; 5(10): 430-9.
- [54] Ferreira SB, Sodero ACR, Cardoso MFC, *et al.* Synthesis, Biological Activity, and Molecular Modeling Studies of 1H-1,2,3-Triazole Derivatives of Carbohydrates as α -Glucosidases Inhibitors *J Med Chem* 2010; 53 (6): 2364-75.
- [55] Araújo JQ, Lima JA, Pinto Ada C, *et al.* Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Model* 2011; 17(6): 1401-12.
- [56] Cassidy CE, Setzer WN. Cancer-relevant biochemical targets of cytotoxic Lonchocarpus flavonoids: A molecular docking analysis. *J Mol Model* 2010; 16: 311-26.
- [57] Paul SB, Choudhury S. Computational analysis of the activity of pongachalcone I against highly resistant bacteria *Pseudomonas putida*. *Bioinformation* 2010; 4(10): 473-7.

- [58] Shityakov S, Dandekar T. Lead expansion and virtual screening of Indinavir derivate HIV-1 protease inhibitors using pharmacophoric - shape similarity scoring function. *Bioinformation* 2010;4(7):295-9.
- [59] Zeng ZS, Liang YH, Feng XQ, *et al.* Lead optimization of diarylpyrimidines as non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *ChemMedChem* 2010; 5(6): 837-40.
- [60] Boyapati S, Kulandaivelu U, Sangu S, *et al.* Synthesis, antimicrobial evaluation, and docking studies of novel 4-substituted quinazoline derivatives as DNA-gyrase inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)* 2010; 343(10): 570-6.
- [61] Yang L, Liu Y, Sternberg C, *et al.* Evaluation of enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitors as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-quenching reagents. *Molecules* 2010; 15(2):780-92.
- [62] Ehrman TM, Barlow DJ, Hylands PJ. In silico search for multi-target anti-inflammatories in Chinese herbs and formulas. *Bioorg Med Chem* 2010; 18(6):2204-18.
- [63] Jimsheena VK, Gowda LR. Arachin derived peptides as selective angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors: structure-activity relationship. *Peptides* 2010; 31(6): 1165-76.
- [64] Büchele B, Zugmaier W, Lunov O, *et al.* Surface plasmon resonance analysis of nuclear factor-kappaB protein interactions with the sesquiterpene lactone helenalin. *Anal Biochem* 2010; 401(1): 30-7.
- [65] Ducati RG, Basso LA, Santos DS, *et al.* Crystallographic and docking studies of purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem* 2010; 18(13): 4769-74.
- [66] Estrada AC, Syrovets T, Pitterle K, *et al.* Tirucallic acids are novel pleckstrin homology domain-dependent Akt inhibitors inducing apoptosis in prostate cancer cells. *Mol Pharmacol* 2010; 77(3): 378-87.
- [67] Thareja S, Aggarwal S, Bhardwaj TR, *et al.* Self-organizing molecular field analysis of 2,4-thiazolidinediones: A 3D-QSAR model for the development of human PTP1B inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010; 45(6): 2537-46.
- [68] Thareja S, Kokil GR, Aggarwal S, *et al.* Sulphonamides as Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B: A Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Study Using Self-Organizing Molecular Field Analysis Approach. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2010; 58(4): 526-32

- [69] Jin Z, Yang L, Liu SJ, et al. Synthesis and biological evaluation of 3,6-diaryl-7H-thiazolo[3,2-b] [1,2,4]triazin-7-one derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Arch Pharm Res* 2010; 33(10): 1641-9.
- [70] Danalache BA, Gutkowska J, Slusarz MJ, et al. Oxytocin-Gly-Lys-Arg: a novel cardiomyogenic peptide. *PLoS One* 2010; 5(10): e13643.
- [71] Muftuoglu Y, Mustata G. Pharmacophore modeling strategies for the development of novel nonsteroidal inhibitors of human aromatase (CYP19). *Bioorg Med Chem Lett* 2010; 20(10): 3050-64.
- [72] Ramalho TC, Tanos CC, Rennó MN, et al. Development of new acetylcholinesterase reactivators: molecular modeling versus in vitro data. *Chem Biol Interact* 2010; 187(1-3): 436-40.
- [73] Zeng ZS, He QQ, Liang YH et al. Hybrid diarylbenzopyrimidine non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors as promising new leads for improved anti-HIV-1 chemotherapy. *Bioorg Med Chem* 2010; 18(14): 5039-47
- [74] Wang S, Yan J, Wang J, et al. Synthesis of some 5-phenylisoxazole-3-carboxylic acid derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010; 45(6): 2663-70
- [75] Tan JJ, Cong XJ, Hu LM, et al. Therapeutic strategies underpinning the development of novel techniques for the treatment of HIV infection. *Drug Discov Today* 2010; 15(5-6): 186-97.
- [76] Provazzi PJ, Arcuri HA, de Carvalho-Mello IM et al. Structural studies of Helicase NS3 variants from Hepatitis C virus genotype 3 in virological sustained responder and non-responder patients. *BMC Res Notes* 2010; 3:196.
- [77] Sun Q, Hirasawa A, Hara T, et al. Structure-activity relationships of GPR120 agonists based on a docking simulation. *Mol Pharmacol* 2010; 78(5): 804-10.
- [78] Sapre NS, Gupta S, Pancholi N, et al. A group center overlap based approach for "3D QSAR" studies on TIBO derivatives. *J Comput Chem* 2009; 30(6): 922-33.
- [79] Khan MT, Fuskevåg OM, Sylte I. Discovery of potent thermolysin inhibitors using structure based virtual screening and binding assays. *J Med Chem* 2009; 52(1): 48-61.
- [80] Pina AS, Roque AC. Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. *J Mol Recognit* 2009; 22(2): 162-8.
- [81] Honda T, Terao T, Aono H, et al. Synthesis of novel 1,4-benzoxazin-3-one derivatives as inhibitors against tyrosine kinases. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(2): 699-708.
- [82] Ogungbe IV, Setzer WN. Comparative molecular docking of antitrypanosomal natural products into multiple *Trypanosoma brucei* drug targets. *Molecules* 2009; 14(4): 1513-36.

- [83] Beausoleil E, Chauvignac C, Taverne T, *et al.* Structure-activity relationship of isoform selective inhibitors of Rac1/1b GTPase nucleotide binding. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19(19): 5594-8.
- [84] Sivaprakasam P, Tosso PN, Doerksen RJ. Structure-activity relationship and comparative docking studies for cycloguanil analogs as PfDHFR-TS inhibitors. *J Chem Inf Model* 2009; 49(7): 1787-96.
- [85] Yang L, Rybtke MT, Jakobsen TH, *et al.* Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(6): 2432-43.
- [86] Bains J, Leon R, Boulanger MJ. Structural and biophysical characterization of BoxC from *Burkholderia xenovorans* LB400: a novel ring-cleaving enzyme in the crotonase superfamily. *J Biol Chem* 2009; 284(24): 16377-85.
- [87] Platis D, Maltezos A, Ma JK, *et al.* Combinatorial de novo design and application of a biomimetic affinity ligand for the purification of human anti-HIV mAb 4E10 from transgenic tobacco. *J Mol Recognit* 2009; 22(6): 415-24.
- [88] Haigh JM, Hussain A, Mimmack ML *et al.* Affinity ligands for immunoglobulins based on the multicomponent Ugi reaction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(14-15): 1440-52.
- [89] Rudolf B, Salmain M, Martel A, *et al.* eta(1)-N-succinimidato complexes of iron, molybdenum and tungsten as reversible inhibitors of papain. *J Inorg Biochem* 2009; 103(8): 1162-8.
- [90] Chauhan P, Shakya M. Model based design of inhibitors for c-jun. *Bioinformation* 2009; 4(6): 223-8.
- [91] Mitrasinovic PM. On the structure-based design of novel inhibitors of H5N1 influenza A virus neuraminidase (NA). *Biophys Chem* 2009; 140(1-3): 35-8.
- [92] Mitrasinovic PM. Advances in the structure-based design of the influenza A neuraminidase inhibitors. *Curr Drug Targets* 2010; 11(3): 315-26.
- [93] Ewing TJ, Makino S, Skillman AG, *et al.* DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J Comput Aided Mol Des* 2001; 15: 411-28.
- [94] Yang JM Development and evaluation of a generic evolutionary method for protein-ligand docking. *J Comput Chem* 2004; 25: 843-57.
- [95] Yang JM, Chen CC. GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins* 2004; 55: 288-304.

- [96] Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem* 2004; 47: 1739–49.
- [97] Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J Med Chem* 2004; 47: 1750–9.
- [98] Kirkpatrick P. Virtual screening: Gliding to success. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 299–9.
- [99] Krovat, E.M.; Steindl, T.; Langer, T., Recent Advances in Docking and Scoring. *Curt Computer-Aided Drug Design* 2005; 1: 93–102.
- [100] Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, *et al.* Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J Med Chem* 2006; 49: 6177–96.
- [101] Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, *et al.* Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* 2003; 52: 609–23.
- [102] Joy S, Nair PS, Hariharan R, *et al.* Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware. *In Silico Biol.*, 2006; 6: 601–5.
- [103] Jain AN. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J Med Chem* 2003; 46: 499–511.
- [104] Canduri F, De Azevedo Jr WF. Protein crystallography in drug discovery. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 1048–53.
- [105] Thilagavathi R, Mancera RL. Ligand-protein cross-docking with water molecules. *J Chem Inf Model* 2010; 50: 415–21.
- [106] Dias MV, Snee WC, Bromfield KM, *et al.* Structural investigation of inhibitor designs targeting 3-dehydroquinase dehydratase from the shikimate pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* 2011; 436(3): 729–39.
- [107] Nelder JA, Mead R. A simplex method for function minimization. *Comput J* 1965; 7(4): 308–13.
- [108] Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, *et al.* Numerical Recipes. The art of scientific computing. 3rd ed. New York: Cambridge University Press 2007.
- [109] Kiusalaas J. Numerical Methods in Engineering with Python. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press 2010.

- [110] Eiben AE, Smith SJ. Introduction to Evolutionary Computing. Berlin: Springer-Verlag 2007.
- [111] Coley DA. An Introduction to Genetic Algorithms for Scientist and Engineers. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. TohTuck Link 1999.
- [112] Goldberg DE. Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning. New York: Addilson-Wiley 1989.
- [113] Holland JH. Adaptation in Natural and Artificial Systems. Cambridge: MIR Press 1992.
- [114] Olariu S, Zomaya AY, Eds. Handbook of Bioinspired Algorithms and Applications. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC 2006.
- [115] Shoemake K. In: Kirk D. Ed. Graphics Gems III. Boston: AP Professional (Academic Press) 1992; pp 124–32.
- [116] Korb O, Stutzle T, Exner TE. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. J Chem Inf Model 2009; 49: 84-96.
- [117] Huang N, Shoichet BK, Irwin JJ. Benchmarking sets for molecular docking. J Med Chem 2006; 49: 6789–801.
- [118] Brooijmans N, Sharp KA, Kuntz ID. Molecular recognition and docking algorithms. Annu Rev Biophys Biomol Struct 2003; 32: 335–373.
- [119] Miteva MA, Violas S, Montes M, *et al.* FAF-drugs: free adme/tox filtering of compound collections. Nucleic Acids Res 2006; 34: W738–W744.
- [120] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Ver 1997; 23: 3-25.
- [121] Vianna CP, de Azevedo WF Jr. Identification of new potential Mycobacterium tuberculosis shikimate kinase inhibitors through molecular docking simulations. J Mol Model. 2011; DOI: 10.1007/s00894-011-1113-5.
- [122] Rudnitskaya A, Török B, Török M. Molecular docking of enzyme inhibitors: A COMPUTATIONAL TOOL FOR STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN. Biochem Mol Biol Educ 2010; 38(4): 261-5.
- [123] Bermúdez-Lugo JA, Rosales-Hernández MC, Deeb O, *et al.* In silico methods to assist drug developers in acetylcholinesterase inhibitor design. Curr Med Chem 2011; 18(8): 1122-36.
- [124] Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, *et al.* Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 9031-5.

- [125] Rizzolio F, Tuccinardi T, Caligiuri, I, *et al.* CDK inhibitors: from the bench to clinical trials. *Curr. Drug Targets* 2010; 11: 279-90.
- [126] Krystof V, Uldrijan S. Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 291-302.
- [127] Hernandez MZ, Cavalcanti SM, Moreira DR, *et al.* Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 303-14.
- [128] Canduri F, de Azevedo WF Jr. Structural basis for interaction of inhibitors with Cyclin-Dependent Kinase 2. *Curr Computer-Aided Drug Design* 2005; 1(1): 53-64.
- [129] Lawrie AM, Noble ME, Tunnah P, *et al.* Protein kinase inhibition by staurosporine revealed in details of the molecular interaction with CDK2. *Nat Struct Biol* 1997; 4: 796-801.
- [130] Scheer M, Grote A, Chang A, *et al.* BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(Database issue): D670-6.
- [131] Otyepka M, Krystof V, Havlicek L, *et al.* Docking-based development of purine-like inhibitors of cyclin-dependent kinase-2. *J Med Chem* 2000;43(13): 2506-13.
- [132] De Azevedo Jr WF, Mueller-Dieckmann HJ, Schulze-Gahmen U, *et al.* Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2735-40.
- [133] De Azevedo Jr WF, Leclerc S, Meijer L, *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 1997, 243, 518-26.
- [134] Krystof V, Cankar P, Frysová I, *et al.* 4-aryloxy-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, crystal structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *J Med Chem* 2006; 49(22): 6500-9.
- [135] Murray AW, Elliott DC, Atkinson MR. Nucleotide biosynthesis from preformed purines in mammalian cells: regulatory mechanisms and biological significance. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1970; 10: 87-119.
- [136] Murray AW. The biological significance of purine salvage. *Annu Rev Biochem* 1971; 40: 811-26.
- [137] Zhang Y, Ealick SE. In: Stroud RM, Finer-Moore J, Ed. *Computational and Structural Approaches to Drug Discovery Ligand-Protein Interactions*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry Publishing. 2008; pp. 49-72.

- [138] De Azevedo Jr WF, Canduri F, Santos DM, *et al.* Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3 Å resolution. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 545-52.
- [139] Santos DM, Canduri F, Pereira JH, *et al.* Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase complexed with acyclovir. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 553-9.
- [140] De Azevedo Jr WF, Canduri F, Dos Santos DM *et al.* Structural basis for inhibition of human PNP by immucillin-H. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 917-22.
- [141] De Azevedo Jr WF, Santos GC, Santos DM *et al.* Docking and small angle X-ray scattering studies of purine nucleoside phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 923-8.
- [142] De Azevedo Jr WF, Canduri F, dos Santos DM, *et al.* Crystal structure of human PNP complexed with guanine. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 767-72.
- [143] Canduri F, dos Santos DM, Silva RG, *et al.* Structures of human Purine Nucleoside Phosphorylase complexed with Inosine and ddI. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 907-14.
- [144] Da Silveira NJF, Uchoa HB, Canduri F, *et al.* Structural Bioinformatics Study of PNP from *Schistosoma mansoni*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 100-4.
- [145] Nolasco DO, Canduri F, Pereira JH, *et al.* Crystallographic structure of PNP from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9 Å resolution. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324:789-94.
- [146] Canduri F, Fadel V, Dias MVB, *et al.* Crystal structure of human PNP complexed with hypoxanthine and sulfate ion. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 335-8.
- [147] Canduri F, Fadel V, Basso LA *et al.* New catalytic mechanism for human purine nucleoside phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 327: 646-9.
- [148] Canduri F, Silva RG, dos Santos DM *et al.* Structure of human PNP complexed with ligands. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2005; 61: 856-62.
- [149] Silva RG, Pereira JH, Canduri F, *et al.* Kinetics and crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase in complex with 7-methyl-6-thio-guanosine. *Arch Biochem Biophys* 2005; 442: 49-58.
- [150] De Azevedo Jr WF, Canduri F, Basso L.A *et al.* Determining the Structural Basis for Specificity of Ligands Using Crystallographic Screening. *Cell Biochem Biophys* 2006; 44: 405-11.

- [151] Timmers LFSM, Caceres RA, Vivan AL, *et al.* Structural studies of human purine nucleoside phosphorylase: towards a new specific empirical scoring function. *Arch Biochem Biophys* 2008; 479: 28-38.
- [152] Caceres RA, Saraiva Timmers LF, Dias R, *et al.* Molecular modeling and dynamics simulations of PNP from *Streptococcus agalactiae*. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 4984-93.
- [153] Timmers LFSM, Caceres RA, Basso LA, *et al.* Structural Bioinformatics Study of PNP from *Listeria monocytogenes*. *Prot Pept Lett*; 2008; 15: 843-9.
- [154] Pauli I, Timmers LFSM, Caceres RA, *et al.* Molecular modeling and dynamics studies of Purine Nucleoside Phosphorylase from *Bacteroides fragilis*. *J Mol Model* 2009; 15: 913-22.
- [155] Timmers LFSM, Caceres RA, Dias R, *et al.* Molecular modeling, dynamics and docking studies of Purine Nucleoside Phosphorylase from *Streptococcus pyogenes*. *Biophys Chem* 2009; 142: 7-16.
- [156] Shi W, Basso LA, Santos DS, *et al.* Structures of purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* in complexes with immucillin-H and its pieces. *Biochemistry* 2001; 40: 8204-15.
- [157] De Azevedo Jr WF, Canduri F, Simões de Oliveira J, *et al.* Molecular model of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 142-8.
- [158] Krell T, Coggins JR, Laphorn AJ. The three-dimensional structure of shikimate kinase. *J Mol Biol* 1998; 278: 983-97.
- [159] Pereira JH, Oliveira JS, Canduri F, *et al.* *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; 60:2310-9.
- [160] Gu Y, Reshetnikova L, Li Y, *et al.* Crystal structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the dynamic role of the LID domain in catalysis. *J Mol Biol* 2002; 319: 779-89.
- [161] Parish T, Stoker NG. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 2002; 148: 3069-77.
- [162] Segura-Cabrera A, Rodriguez-Perez MA. Structure-based prediction of *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase inhibitors by high-throughput virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 3152-7.
- [163] Kumar M, Verma S, Sharma S, *et al.* Structure-based in silico design of a high-affinity dipeptide inhibitor for novel protein drug target Shikimate kinase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol Drug Des* 2010; 76: 277-84.

Figure legends

Fig. (1). Pose (red) and crystallographic structure (light gray) of 2,3-anhydro-quinic acid in the active site of the 3-dehydroquinase dehydratase (dehydroquinase) from *Mycobacterium tuberculosis* (MtDhQase) (PDB access code: 3N7A). Docking sphere (green) with a radius of 15 Å, centered at 8.90, 23.91 and 47.82 Å. RMSD for superposition of the pose and crystallographic position is 0.28 Å. MDSs were performed using MOLDOCK optimizer as search engine and MOLDOCK score [GRID] as scoring function for all structure shown here.

Fig. (2). Pose (red) and crystallographic structure (light gray) of tacrine in the active-site gorge of acetylcholinesterase from *Topedo californica* (PDB access code: 1ACJ) [124]. Docking sphere (green) with a radius of 15 Å, centered at 4.54, 69.93 and 65.54 Å. RMSD for superposition of the pose and crystallographic position is 0.68 Å.

Fig. (3). Pose (red) and crystallographic structure of CDK2 in complex with the inhibitor staurosporine (light gray) (PDB access code: 1AQ1) [129]. Docking sphere (green) with a radius of 15 Å, centered at 0.52, 26.60 and 9.43 Å. RMSD for superposition of the pose and crystallographic position is 0.43 Å.

Fig. (4). Crystallographic (light gray) and respective pose (red) structures for complex of MtPNP and 2'-deoxyguanosine (PDB access code: 3IOM) [65]. Docking sphere (green) with a radius of 15 Å, centered at 5.58, -49.26 and 24.04 Å. RMSD for superposition of the pose and crystallographic position is 0.78 Å.

Fig. (5). Crystallographic (light gray) and respective pose (red) structures for complex of MtSK and shikimate (PDB access code: 1ZYU). Docking sphere (green) with a radius of 15 Å, centered at -1.73, 36.86 and 53.67 Å. RMSD for superposition of the pose and crystallographic position is 1.25 Å.

Figure 1

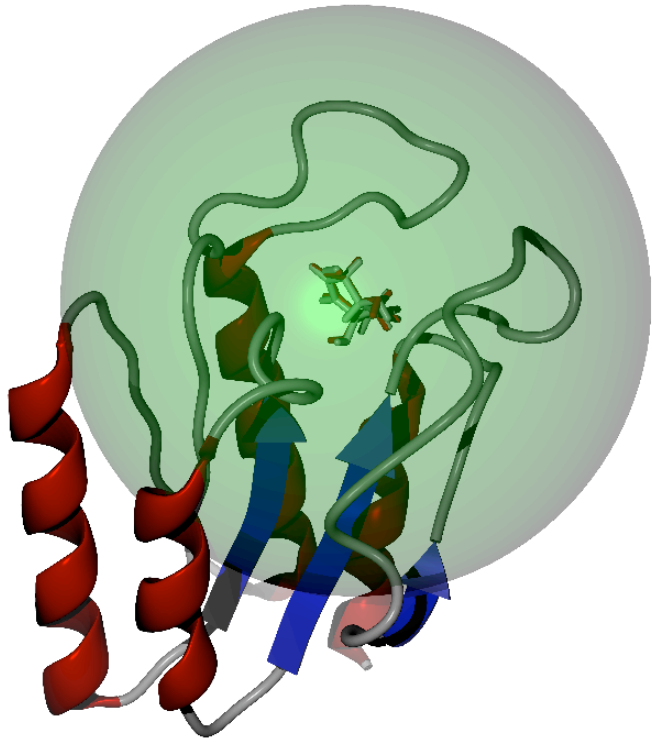


Figure 2

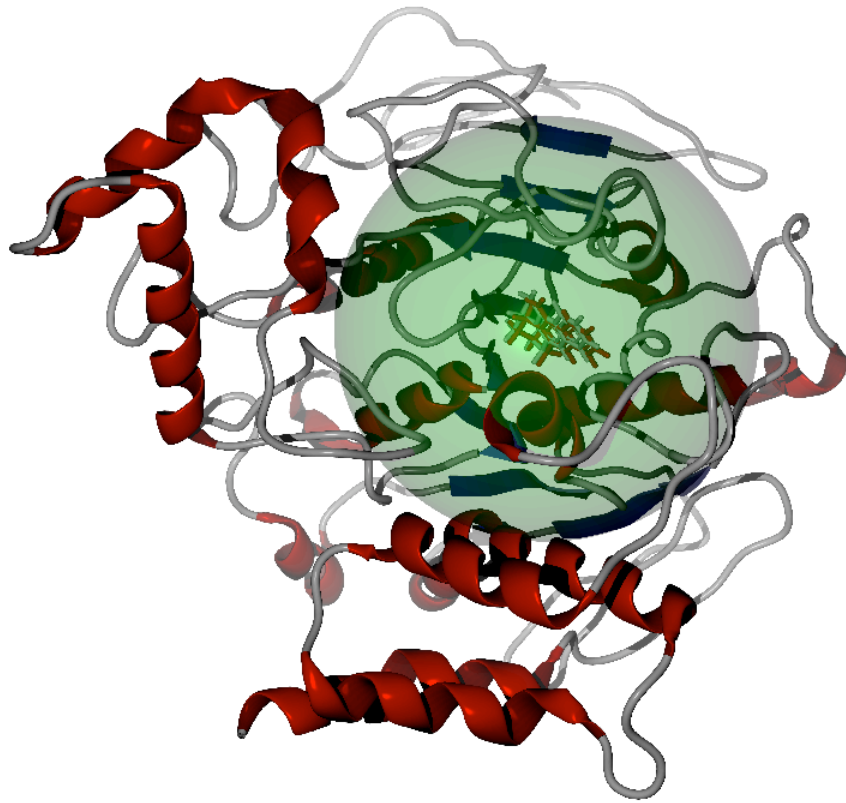


Figure 3

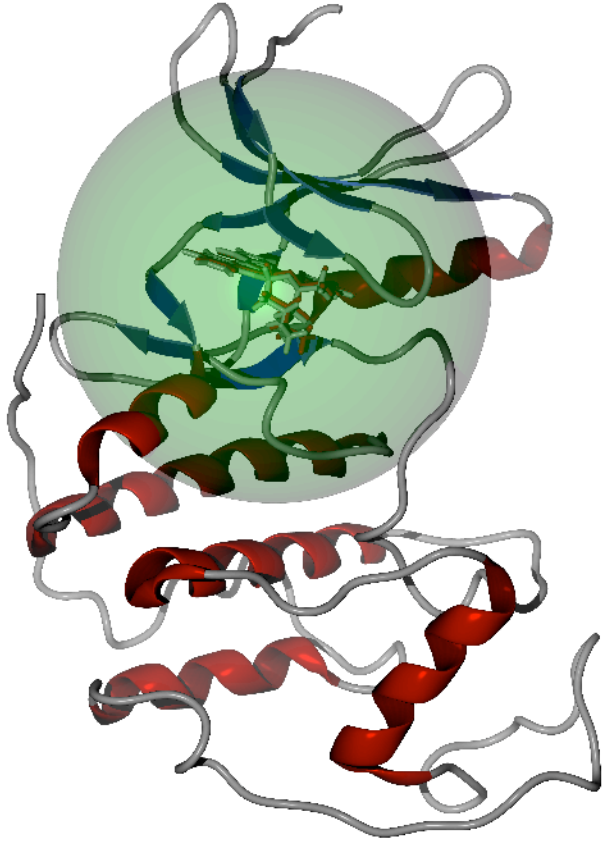


Figure 4

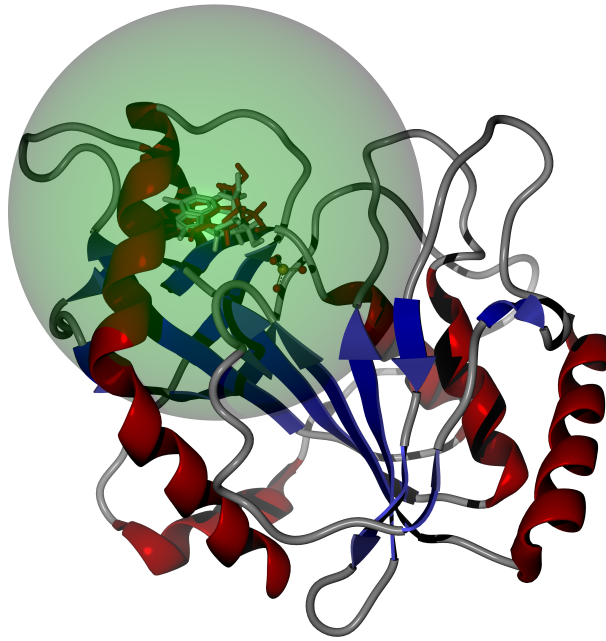
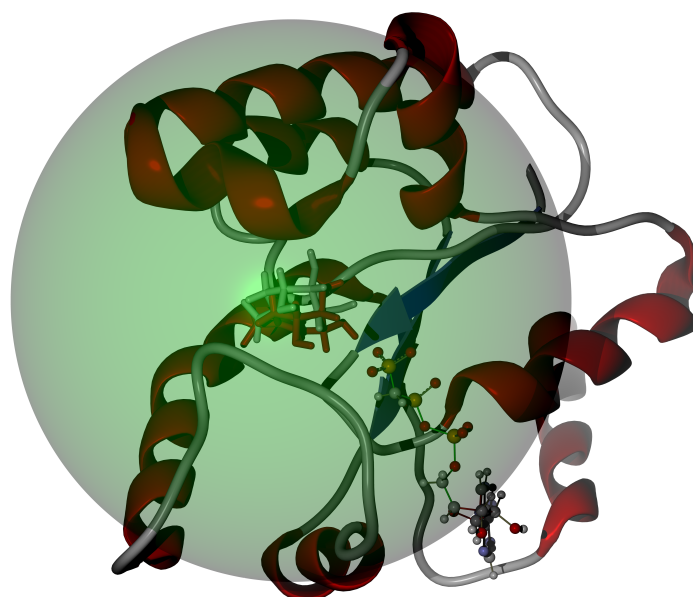


Figure 5



----- Original Message -----

From: "Petar M. Mitrasinovic" <petar.mitrasinovic@yahoo.com>

To: walter@azevedolab.net

Sent: Sex, Set 23, 2011, 11:16 AM

Subject: Special Issue of CBIO (PM Mitrasinovic, Ed): Notice of Acceptance

Dear Prof. Dr. Walter -

I am pleased to inform you that your manuscript in the present form has been accepted for publication in the special issue of *Current Bioinformatics*, P.M. Mitrasinovic, Ed.

Sincerely yours,

-- Petar M. Mitrasinovic

