



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

YRIA JAINE ANDRADE SANTOS

**USO DE MÉTODOS IN SILICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES
COM ATIVIDADE EM MÚLTIPLOS ALVOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA
DE ALZHEIMER**

***USE OF IN SILICO METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF
ALKALOIDS WITH MULTIPLE TARGET ACTIVITY IN THE
TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE.***





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

YRIA JAINE ANDRADE SANTOS

**USO DE MÉTODOS IN SILICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES
COM ATIVIDADE EM MÚLTIPLOS ALVOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA
DE ALZHEIMER**

Dissertação de Mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Sergipe, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Branquinho Oliveira

***USE OF IN SILICO METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF ALKALOIDS
WITH MULTIPLE TARGET ACTIVITY IN THE TREATMENT OF
ALZHEIMER'S DISEASE.***

*Master dissertation presented to the
PostGraduate Program in Chemistry of
the Federal University of Sergipe to
obtain MSc. in Chemistry.*



FICHA CATALOGRÁFICA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Yria Jaine Andrade Santos apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 17/02/2025.

Documento assinado digitalmente



TIAGO BRANQUINHO OLIVEIRA
Data: 17/02/2025 18:37:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Tiago Branquinho Oliveira
Departamento de Farmácia - UFS

Documento assinado digitalmente



JOSE DIOGO DE LISBOA DUTRA
Data: 18/02/2025 08:14:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José Diogo de Lisboa Dutra
Departamento de Química - UFS

Documento assinado digitalmente



CLAUDIO VIEGAS JUNIOR
Data: 19/02/2025 14:51:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Claudio Viegas Junior
Universidade Federal de Alfenas

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química e a Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade de realizar este projeto e pelo suporte estrutural e acadêmico fornecido durante este processo. Estendo esse agradecimento também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro crucial que possibilitou este estudo.

Meus sinceros agradecimentos também ao meu orientador, Tiago Branquinho Oliveira, por todo suporte prestado, pela orientação cuidadosa e por todo conhecimento generosamente compartilhado durante este período de orientação, sendo essência para que esse resultado fosse obtido.

Estendo meus agradecimentos a todos os membros do Computer-Aided Science (CASE) por todo auxílio prestado, pela colaboração, trocas de experiências que ajudaram neste projeto. Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e para minha formação acadêmica. Cada indivíduo e instituição mencionados desempenhou um papel fundamental no sucesso desta jornada acadêmica.

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa prevalente e progressiva, sendo a principal causa de demência global. Apesar da ampla incidência, os tratamentos disponíveis são escassos. Atualmente as buscas por novas opções terapêuticas têm se voltado para as vias colinérgica e glutamatérgica. Abordagens *in silico* são essenciais para identificar substâncias promissoras, reduzindo custos e tempo de pesquisa. O objetivo desse estudo é identificar alcaloides com potencial atividade através de triagem virtual por meio de modelos QSAR e *docking*. Os modelos QSAR foram desenvolvidos a partir de bancos de estruturas testadas nesses alvos. Descritores 2D e 3D foram calculados e avaliados quanto à multicolinearidade e correlação. Modelos foram elaborados com diferentes algoritmos, passando por validação interna e externa, e utilizados para triagem em banco de alcaloides. Os bancos dos alvos NMDA, NACHR e AChE, contêm 91, 100 e 389 estruturas químicas, respectivamente, para os quais foram calculados 7974 descritores. Para o *docking* foram utilizadas as estruturas cristalográficas de código 5EWM, 3SQ6 e 4EY7, e os modelos elaborados foram utilizados para avaliar o comportamento dos alcaloides selecionados para os respectivos sítios e as interações realizadas. Para o modelo NMDA, 8 descritores foram selecionados, sendo o melhor resultado o modelo MLP com $R^2_{\text{TESTE}}=0,654$ e $Q^2=0,533$. Para o modelo NACHR, 6 descritores foram utilizados, com o modelo MLP apresentando $R^2_{\text{TESTE}}=0,861$ e $Q^2=0,672$. Por fim, para o modelo AChE, 7 descritores foram selecionados, com o melhor modelo MLP apresentando $R^2_{\text{TESTE}}=0,872$ e $Q^2=0,605$. Observou-se que em todos os modelos desenvolvidos foram selecionados um ou mais descritores que enfatizavam a importância de compostos nitrogenados para a atividade nos alvos. Essa característica é observada nos ligantes endógenos e fármacos de atuação conhecida neles. Após a validação, os modelos foram utilizados na triagem com o banco de alcaloides, avaliando compostos com maior capacidade de atividade prevista conforme a atuação do alvo na doença. Notou-se que os valores de atividade prevista estavam conforme os valores experimentais de substâncias ativas nos alvos. Além disso, muitas dessas substâncias possuem atividade neuroprotetora relatada, ou pertencem a classes de alcaloides comumente associados a esta atividade. Também foram identificadas substâncias já testadas no alvo, como a boldina selecionada para a AChE. Os resultados da triagem foram submetidos aos modelos de *docking* foram selecionados aqueles de melhor desempenho e com interações favoráveis com os aminoácidos que compõem o sítio ativo. Esse estudo demonstrou a eficiência do uso de métodos *in silico* para identificar alcaloides com potencial atividade frente aos alvos abordados. Os compostos identificados representam importantes opções para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para a doença de Alzheimer.

Palavras-chave: QSAR. NMDA. NACHR. AChE. Alcaloides. Docking.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a prevalent and progressive neurodegenerative disease and the leading cause of dementia worldwide. Despite its widespread incidence, available treatments are scarce. Currently, the search for new therapeutic options has focused on the cholinergic and glutamatergic pathways. In silico approaches are essential to identify promising substances, reducing research costs and time. The aim of this study is to identify alkaloids with potential activity through virtual screening using QSAR and docking models. QSAR models were developed from banks of structures tested on these targets. 2D and 3D descriptors were calculated and evaluated for multicollinearity and correlation. Models were developed with different algorithms, undergoing internal and external validation, and used to screen alkaloid banks. The NMDA, NACHR and AChE target banks contain 91, 100 and 389 chemical structures, respectively, for which 7974 descriptors were calculated. The crystallographic structures coded 5EWM, 3SQ6 and 4EY7 were used for docking, and the models developed were used to evaluate the behavior of the alkaloids selected for the respective sites and the interactions carried out. For the NMDA model, 8 descriptors were selected, with the best result being the MLP model with $R^2_{TEST}=0.654$ and $Q^2=0.533$. For the NACHR model, 6 descriptors were used, with the MLP model showing $R^2_{TEST}=0.861$ and $Q^2=0.672$. Finally, for the AChE model, 7 descriptors were selected, with the best MLP model showing $R^2_{TEST}=0.872$ and $Q^2=0.605$. It was observed that in all the models developed, one or more descriptors were selected that emphasized the importance of nitrogen compounds for target activity. This characteristic is observed in endogenous ligands and drugs known to act on them. After validation, the models were used to screen the alkaloid bank, evaluating compounds with the highest predicted activity according to the target's activity in the disease. It was noted that the predicted activity values were in line with the experimental values of active substances in the targets. In addition, many of these substances have reported neuroprotective activity, or belong to classes of alkaloids commonly associated with this activity. Substances already tested on the target were also identified, such as boldine selected for AChE. The results of the screening were submitted to docking models, and those with the best performance and favorable interactions with the amino acids that make up the active site were selected. This study demonstrated the efficiency of using in silico methods to identify alkaloids with potential activity against the targets addressed. The compounds identified represent important options for the development of new therapeutic options for Alzheimer's disease.

Keywords: QSAR. NMDA. NACHR. AChE. Alkaloids. Docking.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Doença de Alzheimer	1
1.2.	Via Colinérgica	3
1.2.1.	Acetilcolinesterase	3
1.2.2.	Receptor Nicotínico de Acetilcolina	5
1.3.	Via Glutamatérgica	6
1.3.1.	Receptores NMDA	6
1.4.	Quimioinformática	7
1.4.1.	QSAR	8
1.4.2.	Docking Molecular	9
1.5.	Alcaloides	10
1.6.	Trabalhos Correlatos	12
2.	OBJETIVOS	13
2.1.	Objetivo Geral	13
2.2.	Objetivos Específicos	13
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1.	Referencial Teórico	14
3.2.	QSAR	15
3.2.1.	Busca em bancos de estruturas	16
3.2.2.	Preparo do banco de estruturas	16
3.2.3.	Cálculo dos descritores	17
3.2.4.	Seleção dos descritores	18
3.2.5.	Avaliação de multicolinearidade	19
3.2.6.	Desenvolvimento do modelo	19
3.2.7.	Ajuste e validação do modelo	22
3.2.8.	Triagem Virtual	23
3.3.	DOCKING MOLECULAR	23
3.3.1.	Pesquisa de alvos	23
3.3.2.	Redocking	24
3.3.3.	Triagem por Docking	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1.	Modelo NMDA	26
4.2.	Modelo NACHR	34
4.3.	Modelo AChE	39

4.4.	Escolha e Validação do Modelo	44
4.5.	Triagem Virtual.....	48
4.6.	Docking Molecular.....	60
5.	CONCLUSÕES.....	68
6.	PERSPECTIVAS DO TRABALHO.....	70
7.	REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA	–	Doença de Alzheimer
A β	–	β -amiloide
NFT	–	Emaranhados neurofibrilares
ACh	–	Acetilcolina
NACHR	–	Receptores Nicotínicos de Acetilcolina
AChE	–	Acetilcolinesterase
PAS	–	Sítio Aniônico Periférico
SNC	–	Sistema Nervoso Central
NMDA	–	N-Metil-D-Aspartato
iGluR	–	Receptores de Glutamato Ionotrópicos
CADD	–	Descoberta de Medicamentos Auxiliada por Computador
QSAR	–	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
MLR	–	Regressão Linear Múltipla
PCR	–	Regressão de Componentes Principais
PLS	–	Mínimos Quadrados Parciais
RNA	–	Redes Neurais Artificiais
RMSE	–	Desvio Médio Quadrático
SMILES	–	<i>Simplified molecular-input line-entry system</i>
CAS	–	<i>Chemical Abstracts Service</i>
SDF	–	<i>Structure Data File</i>
VIF	–	Fator de Inflação da Variância

MLP – “*Multilayer Perceptron*” com *backpropagation*

SVM – Máquina de Suporte de Vetores

R^2 – Coeficiente de determinação do treino

R^2_{TESTE} – Coeficiente de determinação do teste

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a doença de Alzheimer (DA) corresponde a uma das principais causas de demência em todo o mundo, caracterizada pela perda progressiva da memória e de outras funções cognitivas^{1,2}. Embora a idade seja o principal fator de risco, sua causalidade é bastante complexa e abrange múltiplos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Apesar dos expressivos avanços na compreensão dos mecanismos patológicos da DA, as opções terapêuticas atuais ainda são limitadas^{3,4}.

Sendo essa uma doença de ampla prevalência, tem se tornado um crescente desafio no âmbito da saúde pública, uma vez que são gerados altos custos com saúde e cuidados a longo prazo. Devido esse seu largo impacto socioeconômico, a identificação de novas terapias tem se mostrado de suma importância capazes de retardar a progressão da doença, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes e cuidadores⁵⁻⁷.

A necessidade de identificar compostos para atuarem nesse tratamento põe em destaque classes de substâncias como os alcaloides. Esses compostos de origem natural possuem uma ampla gama de atividades biológicas. Para além, o seu conhecido efeito neuroprotetor torna estes compostos importantes candidatos para o tratamento da DA^{8,9}. A identificação de compostos promissores como estes através do uso de ferramentas *in silico*, como meio de otimizar esse processo de busca, tem sido uma crescente no meio acadêmico¹⁰⁻¹².

A presente pesquisa visa contribuir para a identificação de novos compostos que possam atuar como alternativas terapêuticas para a DA. Elaborando e usando métodos *in silico* para otimizar este processo de identificação, os resultados desse estudo poderão fornecer dados relevantes para a descoberta e desenvolvimento racional de novos medicamentos.

1.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa de caráter crônico, caracterizada pela perda progressiva da memória e de outras funções cognitivas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a doença de

Alzheimer representa cerca de 70% dos casos de demência no mundo todo e cerca de dois terços dos casos de demência em idosos, considerada a forma mais comum de demência^{2,13}. Esta é considerada uma doença multicausal associada a vários fatores de risco como idade avançada, fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, dentre outros e, embora tenha ampla prevalência, os tratamentos disponíveis ainda são limitados, dificultando o manejo eficaz da condição^{4,14}.

A ampla incidência da doença de Alzheimer provoca um impacto econômico significativo na sociedade, uma vez que está associada a altos custos com assistência médica. Os custos com a doença incluem consultas, exames e medicamentos, que podem somar milhões de dólares anualmente, bem como os gastos associados aos cuidados de longo prazo para pacientes em estágios avançados. Os investimentos em pesquisa para entender e combater a doença também se traduzem em bilhões de dólares. Esses números refletem a necessidade urgente de estratégias abrangentes para enfrentar o desafio desta doença, visando reduzir os custos financeiros e melhorar a qualidade de vida dos pacientes e cuidadores¹⁵⁻¹⁸.

Embora seja uma doença de ampla incidência, o tratamento para a DA ainda é limitado, sendo baseado nos quatro fármacos aprovados: donepezila, galantamina, rivastigmina e memantina. Os três primeiros atuam na modulação da via colinérgica, enquanto a memantina atua na via glutamatérgica. O emprego desses fármacos é devido sua ação na atenuação dos sintomas, não havendo evidências quanto efeito de cura. Diante dessas limitações, torna-se evidente a necessidade da busca por novas substâncias que possam atuar não somente reduzindo os sintomas, como também retardando a progressão da DA¹⁹⁻²².

A terapia disponível tem se voltado para a atuação nas vias colinérgicas e glutamatérgicas, intrinsecamente relacionadas aos mecanismos de memória e aprendizado, além de contribuir para o mecanismo de neuroproteção²³⁻²⁵. Embora não haja clareza quanto ao processo patológico, sabe-se que há um acúmulo de proteínas anômalas, em especial a β -amiloide ($A\beta$) na forma de

placas senis e a τ hiperfosforilada na forma de emaranhados neurofibrilares (NFT). Essas proteínas interferem nas vias acima citadas, levando a perda de sinapses e dendritos, que culminam no dano neuronal^{26,27}.

1.2. Via Colinérgica

A hipótese colinérgica é uma das mais antigas no que tange ao conhecimento sobre a DA, tendo seu delineamento iniciado em meados dos anos de 1970. Esta hipótese é baseada na neurodegeneração observada na inervação colinérgica do córtex cerebral, redução dos níveis de colina e da síntese de acetilcolina (ACh). Além disso, é apoiada pela observação do papel agravante desempenhado pelos antagonistas colinérgicos nos quadros de DA e o efeito oposto apresentado pelos agonistas²⁸⁻³⁰.

Esta hipótese é reforçada após a constatação da lesão colinérgica mesmo nos estágios assintomáticos. Observa-se que, a lesão ocorrida nos neurônios colinérgicos leva a alterações nos receptores nicotínicos e muscarínicos. A perda desses receptores associada a deposição das proteínas anômalas, contribuindo significativamente para a deterioração da função cognitiva observada na doença de Alzheimer^{31,32}.

Tendo em vista que parte importante da fisiopatologia da DA relacionada a essa via é a diminuição dos níveis de colina e consequentemente, de ACh, existem duas abordagens possíveis de intervenção nesta via. A primeira delas é por meio de substâncias capazes de atuar de forma semelhante a ACh nos receptores nicotínicos de acetilcolina (NACHR), agindo como um agonista. A segunda alternativa consiste em substâncias que atuem bloqueando a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), impedindo que haja a hidrólise da ACh, para aumentar sua disponibilidade na fenda sináptica³³⁻³⁵.

1.2.1. Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma serina hidrolase que pertence à família das esterases em eucariotas superiores, atuando sobre diversos tipos de ésteres carboxílicos. A AChE possui diversas formas moleculares que se diferem quanto a estrutura quaternária ou modo de ancoragem na sinapse.

Essas formas são distribuídas conforme o tecido em que estão contidas, sendo as formas mais comumente afetadas na DA a AChE-R e AChE-S³⁶⁻³⁸.

Por conta da sua distribuição e importância, a AChE é um alvo para o tratamento de distúrbios neuromusculares, como miastenia gravis e glaucoma, além de atuar como alvo no tratamento da DA. Um dos seus principais mecanismos de ação é o aumento dos níveis de acetilcolina disponíveis para a atuação nos receptores nicotínicos, diminuindo os efeitos da deficiência colinérgica observada na DA^{34,37,38}.

A AChE é uma das principais enzimas do sistema colinérgico, atuando na finalização da transmissão dos impulsos neuronais através da hidrólise rápida da acetilcolina. Estudos consolidados na identificação da fisiopatologia da DA apontam que a acetilcolinesterase está intimamente relacionada ao núcleo amiloide das placas senis, por meio da formação de complexos entre as proteínas β -amiloide e a AChE, aumentando a neurotoxicidade amiloide^{34,36,39}.

A molécula de AChE possui um formato elipsoidal de dimensões $45 \times 60 \times 65$ Å, sendo constituída por 537 aminoácidos e dividida em dois domínios importantes, sendo eles: um sítio ativo e a “garganta” ou desfiladeiro aromático. O sítio ativo é composto de dois subsítios: esteárico e aniônico. O subsítio esteárico, responsável pela maquinaria catalítica, contém a tríade catalítica formada por Ser 203, His 447 e Glu 334. O subsítio aniônico corresponde ao ponto de ligação da colina, por meio da interação com o grupo amino quaternário carregado da porção de colina da ACh, sendo também um ponto de ligação importante para inibidores dessa enzima, este sítio é definido pelos resíduos Trp 86 e Tyr 337^{37,38,40}.

Para além desses dois subsítios, existe um sítio de ligação adicional para a ACh e outros ligantes quaternários, localizado no desfiladeiro aromático, chamado de sítio aniônico periférico (PAS), que sendo revestido por resíduos aromáticos (Trp286, Tyr124, Tyr72 e Tyr341), formam interações π -cátion com a ACh orientando-a para o subsítio aniônico^{37,41}. Esse sítio está envolvido com a inibição por excesso de substrato, característica da AChE, onde em altos níveis de substrato, a atividade da AChE é reduzida⁴¹⁻⁴³.

1.2.2. *Receptor Nicotínico de Acetilcolina*

Os receptores nicotínicos de acetilcolina (NACHRs) são membros de uma superfamília de canais de íons pentaméricos, controlados por ligantes, que quando ativados se tornam permeáveis aos íons sódio, cálcio e potássio. São formados de complexos homo ou heteropentaméricos, os quais podem ser compostos por várias combinações das subunidades deste receptor ($\alpha 2-7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ e $\beta 2-4$). Os principais subtipos presentes no cérebro humano são os receptores heteropentamérico do tipo $\alpha 4\beta 2$ e homopentamérico do tipo $\alpha 7$, são amplamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC) e alvo de uma série de doenças neurológicas e neuropsiquiátricas⁴⁴⁻⁴⁷.

Esses receptores nicotínicos mais presentes no SNC possuem características diferentes daqueles que são apresentados no sistema nervoso periférico. Eles têm uma maior permeabilidade aos íons de cálcio associados ao efeito modulatório de longa duração. A estimulação desses receptores na membrana pré-sináptica leva a um aumento da concentração de cálcio pré-sináptica. Isso facilita liberação de diversos neurotransmissores, como: glutamato, GABA, dopamina, serotonina, norepinefrina e ACh^{48,49}.

Como dito anteriormente, as vias colinérgica e glutamatérgica estão intrinsecamente ligadas. A ativação dos NACHRs leva à liberação do glutamato consumido nesta via. A importância dessa liberação não se restringe apenas aos processos cognitivos, mas também é crucial para a neuroproteção e a manutenção da plasticidade sináptica⁵⁰⁻⁵².

Além desta interação com os receptores glutamatérgicos, os receptores que possuem a subunidade $\alpha 7$ formam complexos com a forma patológica da proteína A β nas placas senis observadas na DA. Esses complexos atingem inclusive os neurônios glutamatérgicos, podendo a A β inibir os $\alpha 7$ -NACHRs e induzindo a liberação transitória de glutamato, que podem levar a hiperativação dos receptores do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA), causando o mecanismo de neurotoxicidade⁵²⁻⁵⁴.

Entretanto, estudos apontam que tanto a proteína A β como os agonistas colinérgicos competem pelo mesmo sítio de ligação nos receptores $\alpha 7$ -NACHR. Essa competição possibilita que substâncias agonistas deste receptor modulem a resposta neurotóxica induzida pela A β , reforçando sua importância como alvo terapêutico^{52–54}.

1.3. Via Glutamatérgica

O glutamato é um dos principais neurotransmissores presentes no cérebro de mamíferos, representando um papel crucial nos mecanismos de memória, aprendizado, cognição e funções motoras. A via de transmissão glutamatérgica é mediada por receptores de glutamato do tipo ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR) são canais iônicos dependentes de ligantes permeáveis a Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. Eles são divididos em três grupos: receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolepropiónico (receptores AMPA), receptores de cainato e receptores de N-metil-D-aspartato (receptores NMDA)^{23,55–57}.

Dentre esses receptores destaca-se o receptor NMDA, sendo o mais envolvido nas alterações excitotóxicas observadas na DA, estando relacionado à plasticidade sináptica de longo prazo. Além disso, a presença da proteína A β é associada a modulação anormal desses receptores, favorecendo sua hiperativação, o que o torna um importante alvo para o tratamento da DA^{52,54,58}.

1.3.1. Receptores NMDA

Os NMDARs são compostos por subunidades NR1, NR2 (A, B, C e D) e NR3 (A e B). Estudos evidenciam que a criação de canais NMDAR funcionais requer a combinação de duas subunidades NR1 e, pelo menos, uma subunidade NR2. Uma vez que os sítios de ligação do glutamato e da glicina estão localizados em regiões homólogas destas subunidades^{59–61}. Esses receptores possuem uma distribuição heterogênea no cérebro, nas regiões mais envolvidas nas funções cognitivas, hipocampo e córtex. As principais subunidades reguladoras são GluN2A e GluN2B, sendo esta última associada aos receptores extra-sináptico, mais atingidos durante a DA^{23,62,63}.

Esses receptores são canais iônicos para cálcio de transmissão rápida, associada ao ligante, uma classe de receptores cuja ativação depende da ligação de dois agonistas distintos, sendo nesse cenário o glutamato um coagonista. A ligação ao glutamato faz com que o canal se abra e seja excitado^{64,65}. Durante o desenvolvimento da DA, o acúmulo de proteínas anômalas inibe a recaptação do glutamato das fendas sinápticas, fazendo com que haja um acúmulo de glutamato na fenda sináptica, resultando em um influxo de cálcio anormal, gerando dano mitocondrial. O dano provocado por esse aumento do influxo de cálcio resulta na excitotoxicidade, produção de radicais livres tóxicos e, por fim, morte celular^{23,55}.

Tendo em vista que esses receptores possuem grande importância fisiológica, é necessário que o antagonismo não seja completo, sendo preferível que isto aconteça seletivamente aos receptores do tipo Glun2B, que estão mais fortemente associados a neuropatologias^{66,67}. Um exemplo do uso desses receptores como alvo para o tratamento da DA é a memantina, um antagonista do receptor NMDA de uso aprovado no tratamento. Além disso, outras substâncias como riluzol, bem como outros antagonistas desse receptor que vêm sendo testados para o tratamento da DA^{63,68,69}.

1.4. Quimiinformática

Neste contexto de ampla necessidade na identificação de novas substâncias como opções terapêuticas, algumas ferramentas de pesquisa têm assumido certo papel de destaque. Dentre elas, destaca-se a quimiinformática, com foco nos métodos de descoberta de medicamentos auxiliada por computador (CADD). Em especial, a triagem virtual tem se mostrado promissora, podendo ser baseada na estrutura do alvo ou nos ligantes⁷⁰⁻⁷².

Quando baseada na estrutura, a triagem considera as características da estrutura tridimensional do alvo biológico, por meio desta são analisadas as interações feitas entre o alvo e os seus ligantes já conhecidos, sendo a principal abordagem dessa técnica o *docking* molecular^{73,74}. Na triagem baseada no ligante, são consideradas as características e padrões

farmacofóricos de estruturas químicas com ação conhecida no alvo em questão, sendo a abordagem mais conhecida a busca por relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR – *Quantitative Structure-Activity Relationship*)^{75,76}.

1.4.1. QSAR

A busca por relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR) é um método de construção de modelos computacionais ou matemáticos. Por meio desse método, é possível identificar correlações estatísticas entre a estrutura e sua função. Para isso, os dados estruturais são calculados e correlacionados com a atividade biológica a fim de prever a atividade de outras estruturas químicas⁷⁷⁻⁷⁹.

Essas informações matemáticas da estrutura são chamadas de descritores. Um descritor é uma variável capaz de representar de forma numérica as informações da estrutura molecular. Eles podem ser baseados na topologia, geometria, constituição, características físico-químicas, dentre outros⁷⁷⁻⁷⁹.

Existem vários tipos de modelos para o QSAR, sendo a precisão desses modelos, essencial para entender a estruturação da informação molecular. A seleção adequada dos descritores moleculares é fundamental para o desenvolvimento de um modelo QSAR de qualidade. As técnicas de análise de dados utilizadas para essa seleção podem ser: regressão linear múltipla (MLR), regressão de componentes principais (PCR), mínimos quadrados parciais (PLS) e métodos baseados em redes neurais artificiais (RNAs). De forma geral, os métodos lineares podem não ser os mais adequados para alvos com múltiplos mecanismos de ação, sendo mais adequado optar por métodos não lineares como as RNAs⁸⁰⁻⁸².

A qualidade de um modelo QSAR está intrinsecamente relacionada à escolha dos descritores e à capacidade destes de identificar padrões associados à atividade. Estes são os principais pontos no processo de desenvolvimento do modelo. É importante que este desenvolvimento compreenda métodos de validação externos e internos, para isso são utilizados um conjunto de dados treino e um conjunto de dados teste, que não

compartilham substâncias entre si. Os resultados são então avaliados com base no coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação externa e validação cruzada externa. Através da validação, é possível determinar que os valores de atividade não são previstos de forma aleatória⁸³⁻⁸⁵.

Uma vez validado, o modelo de QSAR está aprovado para ser utilizado em grandes bancos de dados a fim de selecionar moléculas promissoras para este alvo.

1.4.2. *Docking Molecular*

O *docking* molecular consiste em técnicas que auxiliam a prever a melhor orientação e conformação do ligante em seu sítio ativo no alvo terapêutico. O *docking* é um método capaz de prever a formação do complexo ligante-receptor, e as interações que tornam o complexo possível, e utiliza basicamente duas ferramentas para selecionar as estruturas, o algoritmo de busca e a função de escore⁸⁶.

O algoritmo de busca é um conjunto de regras e parâmetros aplicados para explorar a flexibilidade da estrutura, elaborando um conjunto de orientações e modos de ligação diversos no sítio ativo. Deste modo, previsões quantitativas de energia de ligação são fornecidas e classificadas com base na afinidade de ligação do complexo ligante-receptor. A função de escore, por sua vez, é a ferramenta que fornece o modo de classificação dos ligantes com base na afinidade utilizando como parâmetro as interações do ligante com o sítio ativo, sendo possível, por meio dela, diferenciar as diversas conformações e orientações que um mesmo ligante apresenta⁸⁷⁻⁸⁹.

O *redocking* compreende uma das formas de iniciar o processo de *docking*. Por meio deste, é possível analisar as interações presentes no complexo ligante-receptor e a influência da força dessas interações e a estabilidade da molécula. Ao fim do *redocking* devem ser obtidos métodos de ligação semelhantes ao original, validando assim a capacidade do programa utilizado de prever essas interações⁹⁰⁻⁹².

Para que o *redocking* seja validado, é necessário considerar o valor de RMSD (raiz do desvio quadrático médio), sendo ideal que este valor seja abaixo de 2 Å, a eficiência do modelo é inversamente proporcional a esse valor^{76,93,94}. Existem vários programas que executam o *docking*, cada um com um método de operação diferente, alguns deles são: FlexX, DOCK, GOLD, GLIDE e AutoDock^{71,73}.

1.5. Alcaloides

Os alcaloides constituem o maior grupo de metabólitos secundários. Esses metabólitos são compostos orgânicos produzidos por organismos como bactérias, animais ou plantas. Eles estão relacionados à mediação das interações ecológicas, proporcionando vantagens ao organismo, como defesa contra predadores, competição contra outras espécies e atração de polinizadores^{95,96}.

São compostos químicos de origem natural que contêm um ou mais átomos de nitrogênio como aminas primárias, secundárias ou terciárias, frequentemente em forma de heterocíclicos. Entretanto, além de carbono, hidrogênio e nitrogênio, as moléculas de alcaloides também podem conter enxofre e raramente cloro, bromo ou fósforo^{97,98}.

Os alcaloides podem ser classificados quanto a sua estrutura química e origem biossintética. Quando o nitrogênio é derivado de aminoácidos e apresentam o nitrogênio em anel heterocíclico, como a nicotina, este é um alcaloide verdadeiro. Em alguns alcaloides, o nitrogênio é incorporado a estrutura por precursores que não são aminoácidos, a esse tipo de alcaloide é dada a classificação de pseudo-alcaloide, a exemplo da cafeína. Existem ainda alcaloides chamados de proto-alcaloides derivados de aminoácidos, mas o nitrogênio não está em anel heterocíclico, um exemplo disso é a efedrina^{99,100}.

Esse tipo de metabólitos possui uma ampla gama de atividades biológicas, podendo desempenhar diversos papéis farmacológicos que vão desde atividade antioxidante até atividade anticâncer, possuindo um impacto biológico na saúde humana e na descoberta de novos medicamentos^{94,96}.

Muitos alcaloides como a nicotina, colina, morfina e galantamina são conhecidos pela sua ampla atuação no SNC, em vias associadas ou danificadas pela progressão de doenças neurodegenerativas^{101,102}.

Dado que a nicotina e a galantamina, ambos alcaloides, têm ações específicas no sistema nervoso, é possível inferir que substâncias estruturalmente semelhantes podem ter mecanismos de ação similares. A nicotina, por exemplo, é um ligante do receptor nicotínico de acetilcolina (NACHR), enquanto a galantamina atua como um inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE). Portanto, diante disso, é plausível que outras substâncias semelhantes possam atuar como agonistas ou mediante impedimento estérico em ambos os alvos^{87,103,104}. De forma complementar, tem se considerado a possível atividade dos alcaloides no receptor NMDA, por meio de um antagonismo capaz de reduzir a superativação desses receptores^{105–107}.

Para além disso, outro ponto que destaca os alcaloides como potenciais alternativas terapêuticas para doenças neurodegenerativas é o seu potencial neuroprotetor. Essa classe de substâncias apresenta este efeito por meio de ações em diversas vias, sendo as principais delas a sua atuação na regulação do ciclo celular, homeostase do cálcio e promoção do reparo neuronal, além de sua conhecida atividade antioxidante e anti-inflamatória^{108–110}.

Os alcaloides desempenham um importante papel no combate ao estresse oxidativo, fortemente associado ao dano neuronal. Esse combate se dá principalmente por meio da regulação da atividade de ação antioxidante como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS)^{110,111}. Os processos inflamatórios são críticos no dano neuronal, contribuindo para lesões por meio de efeitos citotóxicos e perturbação da homeostase. A atividade anti-inflamatória dos alcaloides modula a atividade da micróglia e dos astrócitos, mantendo o equilíbrio da resposta inflamatória. Essas ações, com a atuação em alvos específicos para o tratamento da DA, podem potencializar o tratamento^{112–114}.

Tendo em vista tudo que foi exposto e o destaque do uso de ferramentas *in silico* na descoberta de novos potenciais fármacos. O emprego dessas

ferramentas em bancos de substâncias cujo potencial terapêutico para a doença de Alzheimer já é amplamente conhecido, como os alcaloides, torna-se um caminho promissor para a identificação de substâncias como opções terapêuticas para o tratamento da doença de Alzheimer. Inclusive, por meio dessas ferramentas, substâncias que sejam mais seletivas as regiões afetadas podem ser identificadas, reduzindo os efeitos adversos observados no tratamento, tudo isso associado a uma redução significativa dos custos e do tempo relativos à pesquisa^{115,116}.

1.6 Trabalhos Correlatos

Como já mencionado, o uso de ferramentas *in silico* tem passado por uma considerável expansão no processo de desenvolvimento de novos fármacos. Estudos que utilizam a triagem virtual utilizando ferramentas como QSAR e *Docking* molecular têm permitido reduzir o tempo e os custos envolvidos no processo de descoberta de medicamentos^{116,117}.

Tendo em vista as limitações de opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da DA, ferramentas como essa tem se consolidado como uma alternativa promissora na identificação de substâncias com potencial atividade nas vias afetadas pela doença. Estudos como o Kawakami et. al, (1996), foi um dos pioneiros no emprego de técnicas computacionais para a identificação de inibidores da AChE, um dos principais alvos terapêuticos¹¹⁸⁻¹²⁰.

Inicialmente, a maioria dos estudos tinha seu foco na busca por substâncias com atividade inibitória na AChE, utilizando as metodologias de QSAR e de *docking*, de forma conjunta e separadamente. Com o avanço do conhecimento sobre as vias moleculares e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença, outros alvos terapêuticos começaram a ser considerados para a identificação de opções terapêuticas¹²⁰⁻¹²².

Mais recentemente os estudos deixaram de se restringir a apenas um alvo molecular, adotando uma abordagem que considera múltiplos alvo de uma via ou até mesmo alvos de vias distintas. Essa estratégia visa identificar substâncias que atuem simultaneamente em mais de um alvo, atuando em

mecanismos diferentes da doença. Dessa forma há uma otimização da resposta observada no tratamento, reduzindo principalmente os sintomas comuns da DA^{119,123,124}.

O fato de essa ser uma doença de complexa fisiopatologia com uma grande diversidade de alvos disponíveis a serem abordados fornece uma grande diversidade também de estudos disponíveis de abordagens a ser utilizadas. Artigos como o de Fang et al. (2015) aplicam análises de QSAR para prever interações de ligantes com múltiplos alvos relacionados à DA, incluindo AChE e receptores de histamina H₃. Além disso, a triagem de substâncias derivadas de produtos naturais tem ganhando destaque nessa área, a exemplo de triagens com flavonoides, cumarinas e chalconas^{125–129}.

Embora a evidência na literatura seja vasta neste campo, ainda não foram observados estudos que empregassem os alvos considerados nesse estudo, conjuntamente, para identificar compostos promissores. Além disso, também não são observados estudos que realizem essa busca nos alvos abordados, por este trabalho em um espaço químico tão diverso e promissor como é o dos alcaloides. O que confere um caráter inovados a esse trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar triagem virtual por meio de métodos *in silico* como QSAR e *docking* molecular para a identificação de alcaloides com atividade em múltiplos alvos no tratamento da doença de Alzheimer.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer um banco de dados de estruturas químicas contendo dados de atividade nos alvos NMDA, NACHR e AChE;
- Desenvolver um fluxo de filtro e padronização dos dados coletados, garantindo consistência e qualidade;
- Obter descritores químicos 2D e 3D específicos para cada alvo, com base nos dados coletados;

- Criar modelos QSAR individualizados baseados em descritores moleculares e atividades biológicas conhecidas;
- Validar os modelos QSAR através de métodos rigorosos de validação interna e externa.
- Definir os domínios de aplicabilidade para cada modelo desenvolvido.
- Identificar alcaloides com provável atividade por meio da triagem virtual;
- Criar e validar modelos de *docking* molecular para avaliar a interação dos compostos com os alvos NMDA, NACHR e AChE;
- Analisar as relações estrutura-atividade descobertas pelos modelos QSAR e de *docking*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Parte da metodologia deste trabalho foi publicada no relatório final em agosto de 2021 no site <<https://ri.ufs.br/bitstream/>> como requisito dos trabalhos premiados com o “Prêmio Destaque do 31º Encontro de Iniciação Científica”.

A identificação de substâncias promissoras para o tratamento da doença de Alzheimer tem como principal etapa a elaboração e validação do modelo QSAR e o seu uso para triagem virtual¹³⁰. Essa etapa exige uma extensa busca quanto aos mecanismos envolvidos na DA e aos alvos que serão abordados nessa pesquisa.

3.1. Referencial Teórico

O referencial teórico foi elaborado através da busca por artigos nas bases de dados: PubMed, Scifinder, Scielo e Scopus. Estes foram filtrados priorizando aqueles que possuísem como tema a doença de Alzheimer, sua fisiopatologia e os receptores e mecanismos envolvidos. A partir dessa busca foram definidos como alvos terapêuticos de foco dessa pesquisa o receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA), como representante da via glutamatérgica, envolvida na fisiopatologia da DA, o receptor nicotínico de acetilcolina (NACHR)

e a acetilcolinesterase (AChE), representado a via colinérgica associada a doença.

Tendo sido determinados os alvos abordados, realizou-se outra busca nas mesmas bases, objetivando artigos que abordassem a morfologia e aspectos importantes na ativação destes, bem como a sua participação na doença de Alzheimer.

3.2. QSAR

Para o desenvolvimento do modelo de busca usando o QSAR, algumas etapas são necessárias previamente, como pode ser observado na Figura 1. Tendo elaborado um referencial teórico sobre a doença de Alzheimer e o receptor de escolha, os próximos passos compreendem a busca e escolha de um banco de dados de substâncias previamente testadas no alvo terapêutico de escolha.

As coordenadas 3D para as estruturas dessas substâncias foram geradas para o posterior cálculo e seleção dos descritores, que foram utilizados para a criação do modelo de busca, que, por fim, foi validado. Uma vez que esta validação foi feita, bancos de dados, com estruturas diferentes da sua elaboração, foram submetidos ao modelo para a predição das atividades.

Esse processo de elaboração foi realizado com todos os alvos acima citados separadamente, fazendo com que tenham sido obtidos ao final desse processo modelos diferentes e particulares para cada um deles.

Figura 1: Etapas de desenvolvimento do modelo QSAR.



Fonte: Elaboração Própria.

3.2.1. Busca em bancos de estruturas

Tendo definido os alvos aos quais a busca foi direcionada, foram feitas pesquisas em bases de dados como ChEMBL¹³¹ e BindingBD¹³². O objetivo foi identificar substâncias químicas que já haviam sido testadas nos receptores NMDA e NACHR e na enzima AChE que apresentaram atividade semelhante a que foi buscada nesses alvos para o tratamento da doença de Alzheimer.

Foi definido, com base no tipo de ação pretendida para cada alvo, que as atividades deveriam estar expressas em valores de IC50, para a AChE e NMDA, e EC50 para o NACHR. Isso se deve a busca por atividade antagonista no receptor NMDA e na enzima AChE e agonista no NACHR. Os bancos selecionados continham estruturas químicas das substâncias testadas, consideradas ativas e inativas para os receptores.

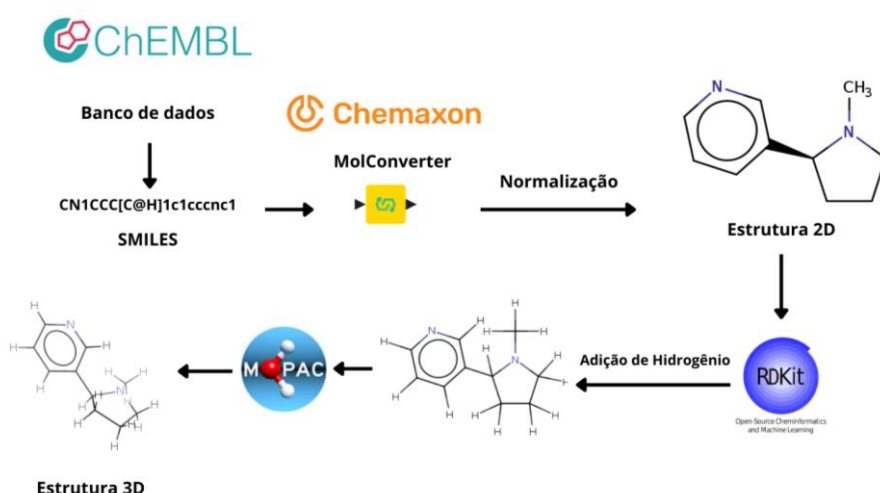
3.2.2. Preparo do banco de estruturas

Os bancos obtidos foram importados para o *software* KNIME *Analytics*, versão 5.3.3 (KNIME AG, Alemanha) e efetuou-se um tratamento prévio dos dados, utilizando filtros, por meio dos quais foi possível excluir estruturas

químicas duplicadas, identificadas por meio dos SMILES (*Simplified Molecular-Input Line-Entry System*). Desta forma, somente as informações necessárias para a criação do modelo de previsão, como: nome, número CAS (*Chemical Abstracts Service*), fórmula molecular e SMILES foram mantidos.

O nó “Mol Converter” (ChemAxon, Hungria) foi utilizado para normalizar e convertê-las para o formato 2D, às quais foram adicionados os hidrogênios utilizando os nós do “RDKit” (Novartis, Suíça). Em seguida as estruturas foram geradas com o “RDKit” e inicialmente minimizadas utilizando o campo de força MMFF94s. Posteriormente, foi realizada uma segunda etapa de minimização com o *software* MOPAC, utilizando o método semi empírico PM7, para refinar a geometria. As estruturas 3D obtidas foram salvas em formato .sdf (*Structure Data File*).

Figura 2: Fluxograma de trabalho para a obtenção de estruturas 3D.



Fonte: Elaboração Própria.

3.2.3. Cálculo dos descritores

Para o cálculo dos descritores foram utilizados quatro *softwares*, dois para o cálculo exclusivo de descritores 2D, o Mold2 e o RDKit e outros dois que fazem cálculos 2D e 3D, o AlvaDesc e PaDEL. Para este cálculo são utilizados os arquivos em formato .sdf, onde estão contidas as informações químicas 2D

e 3D referentes a cada uma das moléculas no banco, para os três bancos obtidos.

3.2.4. *Seleção dos descritores*

O processo de seleção de descritores, bem como as demais etapas que envolvem a elaboração do modelo, foram realizados utilizando nós implementados no KNIME. Durante esse processo, efetuou-se uma exclusão prévia de descritores utilizando os critérios de baixa variância e alta correlação, foi definido como limite para a variância o valor de 0,05 e para limite de correlação o valor de 0,8.

Como dito anteriormente, a seleção dos descritores é uma das etapas cruciais para o desenvolvimento de um modelo QSAR com boa capacidade preditiva. Por conta disso, várias técnicas podem ser empregadas a fim de avaliar quais dos diversos descritores disponíveis estavam mais associados à atividade observada no alvo. Desta forma, um dos métodos que pode ser empregado para definir quais descritores contribuem de forma mais relevante para a atividade é por meio do uso de técnicas de modelagem que permitem analisar essa relação¹³³.

Desta forma, após exclusão de descritores redundantes, foi feita uma seleção prévia dos descritores usando técnicas de modelagem que utilizam funções de pontuação, como os métodos de regressão linear. Por meio da regressão linear foi possível elencar os descritores quanto a sua importância na previsão de atividade para os alvos em questão^{77,134}.

A análise dessas técnicas de modelagem permitiu definir a contribuição de cada descritor para a determinação da atividade, estabelecendo quais descritores possuem maior importância neste processo^{77,134}. Foram testados mais de um modelo de regressão, tanto separadamente quanto em conjunto com outros. O resultado foi analisado quanto ao coeficiente de determinação (R^2) e a raiz do erro quadrático médio (RMSE).

Tendo sido selecionados os descritores de maior probabilidade de contribuição para a atividade para o alvo em questão, o banco de dados foi então dividido seguindo o particionamento randômico, em treino, com 80% das estruturas, e teste, com 20% das estruturas. A seleção dos descritores utilizada no modelo foi feita usando o nó “R Snippet” com o pacote kofnGA (um algoritmo genético com seleção de subgrupos com tamanho fixo). Os descritores selecionados foram analisados quanto à correlação entre eles, onde foram considerados bons os valores de correlação menores que 0,6.

3.2.5. Avaliação de multicolinearidade

Após a seleção dos descritores, eles foram avaliados quanto à sua multicolinearidade. A multicolinearidade ocorre quando duas ou mais variáveis independentes em um modelo de regressão múltipla são altamente correlacionadas linearmente. Essa correlação indica informações redundantes, o que poderá prejudicar a precisão e estabilidade do modelo, pois a multicolinearidade pode inflar o erro padrão dos coeficientes de regressão¹³⁵.

Para avaliar esta situação, foi utilizado o Fator de Inflação da Variância (VIF), uma métrica que fornece uma estimativa de quão muito a variância de um coeficiente de regressão estimado é aumentada devido à multicolinearidade. O VIF foi calculado para cada variável independente e, para evitar indicações de multicolinearidade, os descritores com valores de VIF superiores a 10 foram removidos do modelo^{136,137}.

3.2.6. Desenvolvimento do modelo

Os descritores selecionados foram utilizados para elaborar modelos de predição de atividade. Quatro algoritmos foram testados para a modelagem: regressão linear, regressão do tipo PACE, redes neurais artificiais do tipo “*Multilayer Perceptron*” com *backpropagation* (MLP) e máquina de suporte de vetores (SVM). O desenvolvimento desses modelos foi realizado utilizando os nós do Weka (*Waikato Environment for Knowledge Analysis*), versão 3.7 (University of Waikato, Nova Zelândia).

A regressão linear em contextos de pesquisa QSAR é capaz de identificar uma relação quantitativa entre as características estruturais, expressas através dos descritores e os valores de atividade biológica observados no banco de moléculas fornecido. Em um modelo simples de regressão linear, o método dos mínimos quadrados é utilizado para minimizar a soma dos resíduos ao quadrado, sendo as diferenças entre os valores observados e os valores preditos pelo modelo^{138,139}. Embora a regressão do tipo PACE também seja um método linear, esta apresenta certa vantagem em algumas ocasiões em que há valores atípicos e multicolinearidade, uma vez que se apresenta como um método mais sensível e robusto^{140,141}.

Os nós de algoritmos lineares fornecidos pelo Weka possuem configurações de funcionamento pré-definidas para cada nó. No caso do nó utilizado para a regressão linear, a principal modificação que pode ser empregada a fim de obter o melhor modelo possível é nos atributos de seleção utilizados pelo nó. Os métodos disponíveis são: nenhuma seleção de atributo, seleção de atributo usando o método M5, no qual são percorridos os atributos removendo aquele com o menor coeficiente padronizado até que nenhuma melhoria seja observada na estimativa do erro dada pelo critério de informação de Akaike, e uma seleção otimizada usando a métrica de informação de Akaike¹⁴².

Quanto aos métodos utilizados para o ajuste do modelo de regressão do tipo PACE, a obtenção do melhor modelo pode ser feita através da modificação do estimador. O nó do Weka disponibiliza 11 estimadores, que permitem reduzir o erro quadrado médio desses modelos, possibilitando a obtenção de modelos melhores. Todos os estimadores foram testados a fim de definir qual forneceria o melhor modelo para determinado conjunto de dados^{143,144}.

Também foi testado o desempenho de algoritmos não lineares, como as Redes Neurais Artificiais do tipo MLP. A MLP é composta por nós distribuídos em camadas de entrada, camadas ocultas e camadas de saída, todas as camadas estão interconectadas com pesos ajustáveis. Durante o treinamento,

os dados de entrada são processados por meio de funções de ativação não lineares nas camadas ocultas, resultando na saída^{145–147}.

O treinamento ocorre via *backpropagation*, um método supervisionado que ajusta os pesos para minimizar o erro entre a saída prevista e a real. Esse método propaga o erro de trás para frente, ajustando os pesos de forma iterativa^{145–147}.

Foram testadas diversas configurações a fim de definir qual apresentaria o melhor modelo. Para isso, foram testados os seguintes parâmetros: número de camadas ocultas (-H), taxa de aprendizagem (-L), com valores entre 0,001 e 1, taxa de *momentum* (-M), com valores entre 0,001 e 1, tempo de treino (-N), com valores entre 1 e 1000 e seed (-S) com valores entre 1 e 69. As combinações feitas foram avaliadas conforme o coeficiente de determinação do treino (R^2) e do teste (R^2_{TESTE})^{148,149}.

Adicionalmente, foram testados algoritmos como o SVM, que pode ser linear ou não linear a depender do kernel utilizado para a elaboração de modelo. De maneira geral, para o SVM, o kernel é uma função responsável por transformar os dados de entrada em um espaço de dimensionalidade maior. Isso permite que o algoritmo encontre o hiperplano que melhor estratifique os dados em diferentes classes, sendo ideal em situações em que originalmente os dados não são linearmente separáveis no espaço original^{150–152}.

O SVM para análise de regressão visa encontrar uma função que explique a relação entre as variáveis de entrada e a variável contínua, para minimizar o erro de previsão, diferenciando-se dos outros métodos lineares, uma vez que o erro é definido de forma diferente e única. Os dois algoritmos fornecidos pelo SVM são a regressão de vetores de suporte (SVR) e nu-regressão de vetores de suporte (v-SVR)^{153,154}.

No algoritmo SVR existe uma margem de tolerância (ϵ), que funciona como um limite para os erros. Quando o erro de previsão é menor que o valor de ϵ , esse erro é então ignorado. Enquanto na v-SVR é utilizado o parâmetro ν , que delimita o limite de previsões que podem estar erradas e quão erradas elas

podem estar. Ambos os métodos pretendem tornar o modelo simples para evitar o sobreajuste, não se limitando a memorizar os dados, mas também aprendendo com eles^{155–157}.

Além de considerar o kernel e o algoritmo a ser utilizado, outros parâmetros disponibilizados pelo nó foram modificados e testados a fim de observar o efeito nos resultados obtidos. Foram testadas configurações que consideravam os parâmetros: “cost” (-C), variando em um intervalo 0,1 e 1000, gamma (-G), variando em um intervalo entre 0,001 e 100, eps (-E) e coef0 (-R), variando no intervalo entre 0,1 e 1, e “degree” (-D), variando entre 1 e 3¹⁵⁸.

3.2.7. Ajuste e validação do modelo

Os modelos foram avaliados utilizando a validação interna e externa, e os nós disponibilizados pelo Enalos (NovaMechanics Ltd, Portugal) implementados no Knime, com intenção de definir o domínio de aplicabilidade do modelo para o teste externo e triagem virtual¹⁵⁹. Para isso foi utilizado o método de extrapolação em conjunto com a análise das medidas de similaridade, para definir o espaço químico ao qual o modelo pode ser aplicado e sua capacidade de predição para as estruturas da triagem virtual^{160,161}. Essa avaliação foi realizada utilizando os nós do Enalos “*Domain – Similarity*” e “*Domain – Leverage*”, respectivamente, a fim de avaliar qual dos dois critérios se adequa de maneira satisfatória ao conjunto de estruturas químicas utilizados para a elaboração do modelo.

A qualidade de ajuste e a capacidade preditiva do modelo foram validadas considerando os critérios estatísticos estabelecidos por Tropsha et al.^{162–164} na literatura, sendo eles: coeficiente de determinação entre as atividades previstas e observadas, validação cruzada externa, o coeficiente de correlação externa, inclinações k e k' das linhas de regressão através da origem, esses dados foram obtidos utilizando o nó “*Model Acceptability Criteria*”, disponibilizado pelo Enalos^{162,165}.

Também foi realizada a validação por meio do Y-randômico, um método que utiliza teste de permutação, onde os valores das variáveis dependentes

são permutados aleatoriamente, enquanto os valores das variáveis independentes são mantidos. Os dados permutados são utilizados para treinar o modelo, permitindo avaliar a probabilidade de as previsões do modelo ocorrerem ao acaso. A comparação do desempenho do modelo original com o modelo permutado possibilita a avaliação da confiabilidade do modelo original^{166–168}.

3.2.8. *Triagem Virtual*

Foi realizada utilizando o banco de estrutura de alcaloides elaborado pelo *Computer Aided-Science*, descritos na literatura. Para o uso desse banco, foram calculados os descritores para cada uma das substâncias. Os valores foram normalizados seguindo os mesmos parâmetros de normalização fornecidos na entrada do modelo e os resultados foram classificados conforme a atividade prevista.

3.3. DOCKING MOLECULAR

Para o desenvolvimento do modelo de *docking* e o seu posterior uso na avaliação do comportamento das estruturas no alvo foram necessárias algumas etapas. A primeira etapa foi, a partir da revisão bibliográfica, escolher os complexos cristalográficos dos receptores NMDA, NACHR e AChE no Protein Data Bank (PDB). As etapas seguintes foram o preparo das estruturas selecionadas, para enfim definir os padrões de configuração a ser utilizados.

3.3.1. *Pesquisa de alvos*

Na plataforma PDB foi feita uma busca pelos alvos. Os resultados da busca foram analisados quanto a características como o método de obtenção, valor de resolução, além de ter sido dada preferência de escolha às estruturas que estavam complexadas com ligantes de atividade semelhante a que estava sendo buscada em cada um dos alvos. Para cada um dos alvos abordados foi selecionada uma estrutura para a elaboração de um modelo de *docking* molecular.

3.3.2. Redocking

Para o *redocking* foi utilizado o programa GOLD, nele as proteínas, em formato PDB, foram submetidas a extração do ligante de interesse. O ligante removido foi utilizado como referência para a definição do sítio ativo e foi posteriormente reinserido em seu sítio no processo de *redocking*. Para essa reinserção, em suas respectivas proteínas, foram testadas as funções de pontuação ChemScore, ChemPLP, GoldScore e ASP, disponibilizadas pelo *software* e frente a cada uma dessas funções, diferentes valores de raio para o sítio, sendo eles: 6 Å, 8 Å, 10 Å, 12 Å e 14 Å.

Os resultados desses testes foram avaliados e selecionados com base na média dos valores de desvio médio padrão (RMSD) obtidos para cada uma das poses geradas. Para o modelo ser considerado válido é importante que esse valor não exceda 2 Å, sendo escolhida sempre a configuração com menor valor^{169,170}.

3.3.3. Triagem por Docking

Foram realizadas as simulações de docagem molecular por meio dos modelos de *docking* validados através da etapa anterior. Para essa simulação foram utilizados os compostos previamente selecionados pelos modelos QSAR elaborados.

Os compostos foram então avaliados quanto à pontuação obtida e posteriormente avaliado quanto às interações apresentadas com os aminoácidos importantes para a atividade, utilizando o *software* Discovery Studio, versão 2024 (BIOVIA, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado da busca para a definição de alvos promissores para o tratamento da doença de Alzheimer, foram definidos três alvos diferentes, que atuam nas principais vias neurológicas associadas a essa condição, e que estão correlacionados, embora atuando em caminhos diferentes.

No que diz respeito a via glutamatérgica, o alvo selecionado foi o receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Este encontra-se intimamente relacionado com a fisiopatologia da DA, visto que a sua hiperativação está intrinsecamente relacionada com a produção de radicais livres e morte neuronal. O bloqueio seletivo do receptor desencadeia a neuroproteção de áreas diretamente associadas à perda neuronal na doença de Alzheimer. De forma mais específica, a subunidade GluN2B é mais comumente associada às áreas afetadas pela DA^{58,62}.

Quanto a via colinérgica, intrinsecamente associada ao mecanismo dos sintomas da DA, foram selecionados dois alvos. Um amplamente conhecido no tratamento, a enzima acetilcolinesterase (AChE), que já possui drogas que atuam como inibidores aprovadas para o tratamento da DA. Tais drogas reagem com os sítios aniônicos e esteéricos dessa enzima formando complexos por meio de ligações covalentes inibindo de forma temporária essa enzima^{38,171}.

O outro alvo escolhido foi o receptor nicotínico de acetilcolina (NACHR), intimamente associado a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Esse receptor não está restrito a Ach, atuando não somente na via colinérgica para a redução dos sintomas, mas também em vias alternativas que podem auxiliar na melhora do quadro. Quanto a esse receptor, a prioridade é a ação nos receptores com as subunidades $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ mais abundantemente distribuídas no SNC^{38,172}.

Tendo sido definidos os alvos que serão foco desta pesquisa, foi realizada a busca, por meio de palavras-chave, em bases de dados como o ChEMBL. Esta busca foi filtrada para a identificação de substâncias testadas em *Homo sapiens*. Uma vez aplicado esse filtro, os seguintes resultados foram obtidos: para o receptor NMDA, a pesquisa retornou três alvos com os seguintes códigos: ChEMBL1904, ChEMBL1907603 e ChEMBL2094124. O banco ChEMBL1904 foi o escolhido para a elaboração do modelo tendo em vista a maior diversidade de estruturas químicas.

Para a enzima AchE, 36 bancos foram encontrados, dos quais, seguindo a mesma lógica de diversidade química do banco anteriormente, definiu-se a escolha do banco ChEMBL220 para a elaboração do modelo para AchE.

Por fim, para o NACHR a busca por bancos resultou em 26 bancos que atendem esse receptor, dos quais foi escolhido aquele que se restringia à subunidade $\alpha 7$, mais associada à patologia em questão, de código ChEMBL2492.

Cada um dos bancos escolhidos foi tratado separadamente, mas seguindo a mesma lógica de trabalho, que consiste em definir uma unidade de quantificação de atividade padrão para ser avaliada, e onde foram excluídas substâncias duplicadas ou com informações faltantes. A partir deste ponto, os resultados para as etapas de elaboração dos modelos de identificação de substâncias com atividade promissora nos alvos serão tratados separadamente nas seções a seguir.

4.1. Modelo NMDA

O banco selecionado, ChEMBL1904, possui ao todo 444 estruturas químicas, sendo definida a atividade biológica através dos valores de concentração inibitória (IC₅₀). O banco foi exportado para o *software* KNIME *Analytics*, onde foram mantidas apenas as estruturas com valores de atividade expressos em IC₅₀. Aquelas estruturas químicas com informações incompletas ou que estavam duplicadas foram excluídas. Sendo assim, ao final desse processo o banco resultante possuiu 103 estruturas químicas, utilizadas para a elaboração do modelo.

Ao fim deste pré-tratamento, as estruturas do banco foram normalizadas e redesenhadas no formato SMILES canônico. Esse formato garante que as moléculas sejam representadas de forma única, evitando que haja estruturas duplicadas, resultando na conformação 2D das estruturas químicas do banco. Foram adicionados os hidrogênios faltantes a essas estruturas e geradas as estruturas 3D, nas quais foi realizada a minimização de energia utilizando o método MMFF94s.

A minimização de energia é em um processo computacional utilizado para ajustar a geometria da molécula visando obter sua conformação mais estável, ou seja, aquela com a menor energia potencial possível em um determinado modelo teórico. A minimização assegura que a estrutura 3D utilizada seja plausível conforme os critérios físico-químicos, além contribuir para a obtenção de descritores moleculares 3D mais consistentes e representativos^{173,174}.

O método MMFF94s é uma versão do campo de força molecular da Merck que considera os campos de força para descrever adequadamente o ligante e o seu receptor, tanto isoladamente quanto quando estão ligados. Esse método é capaz de localizar com precisão os mínimos conformacionais e descrever de forma satisfatória os perfis e barreiras de torção intervenientes. Além disso, o MMFF94s garante geometrias com minimização de energia quase planas para o nitrogênio trigonal localizado, algo que não é possível pelo método MMFF94. Por fim, as estruturas 3D obtidas foram salvas em formato .sdf^{175–178}.

Tendo em vista que um dos objetivos deste trabalho é a aplicação do modelo desenvolvido para a identificação de alcaloides com provável atividade nesses receptores. No banco com estruturas 3D são captadas as informações das estruturas 3D no formato de *fingerprints* tanto para o banco ChEMBL como para o banco de alcaloides. Realizou-se uma análise de similaridade entre esses dois bancos com base no coeficiente de Tanimoto, onde foram mantidas aquelas estruturas que apresentaram valores de coeficientes maiores que 0,5, o que resultou em 91 estruturas.

Uma vez realizado esse filtro, efetuou-se o cálculo de descritores. A fim de abranger a maior gama de características e dados possíveis, foram calculados os descritores utilizando quatro *softwares*: PaDEL, AlvaDesc, para o cálculo de descritores 2D e 3D, e Mold2 e RDKit, para o cálculo de descritores 2D. Foram calculados 1448 descritores no PaDEL, 5633 descritores no AlvaDesc, 124 descritores no RDKit e 779 descritores no Mold2, totalizando 7974.

Efetuu-se uma pré-seleção e tratamento desses descritores para excluir aqueles que não haviam sido calculados para todas as estruturas. Além disso, foram excluídas as substâncias que apresentaram erros nos cálculos ou que não obtiveram resultados. Os descritores foram normalizados para diminuir a variância entre eles. Foram utilizados filtros de baixa variância e alta correlação. O limite inferior para a variância foi definido como 0,1, onde se manteve 3540 descritores. Para o filtro de correlação, o limite máximo foi definido como 0,8, resultando em um total de 1278 descritores.

Essa pré-seleção gera um conjunto de variáveis capazes de fornecer informações essenciais sobre os dados sem que haja redundâncias, variáveis muito correlacionadas, ou que não conseguem diferenciar as estruturas do banco utilizado^{179,180}. Tendo em vista que o número de descritores resultantes desta pré-seleção ainda é elevado, buscou-se uma forma de manter apenas aqueles descritores mais relevantes para a determinação da atividade do composto no alvo dado. Para isso, foram elaborados modelos lineares com os descritores disponíveis. Nesses modelos foi observada a importância das variáveis para o modelo elaborado.

Foram testados mais de um tipo de modelo linear, a fim de identificar qual abordagem o resultado mais promissor, neste processo foram elaborados modelos de regressão linear do tipo Random Forest, Partial Least Squares (PLS), Gradient Boosting Machine (GBM), Operador de seleção e redução mínima absoluta (LASSO), Extreme Gradient Boosting (XGBOOST) e Gradient Boosting com modelos lineares com base em componentes (GLMBOOST). Para cada um desses modelos, foi avaliado o desempenho dos descritores selecionados como de maior importância para a elaboração de modelos de regressão linear.

Os modelos foram ranqueados quanto aos valores obtidos de coeficiente de determinação do teste externo (R^2_{TESTE}) e quanto a raiz do erro quadrático médio (RMSE). Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 1. Não foram obtidos bom modelo de regressão linear para o algoritmo XGBOOST, a isso pode-se atrelar que algoritmos diferentes possuem

complexidade e otimizações específicas, que requerem ajustes precisos de hiperparâmetros para alcançar resultados ideais¹⁸¹.

Tabela 1: Resultados dos modelos obtidos para cada algoritmo.

ALGORITMOS	R ²	RMSE
RANDOM FOREST	0,95	0,3
LASSO	0,88	0,34
PLS	0,78	0,41
GBM	0,76	0,55
GLMBOOST	0,72	0,5

Fonte: Elaboração própria

Com base nos resultados obtidos foi possível observar que o melhor desempenho foi obtido com o algoritmo Random Forest. Por meio deste algoritmo, após a análise de importância, foram mantidos 201 descritores.

O banco foi então estratificado em treino, com 68 substâncias, e o conjunto teste, com 23 substâncias, seguindo a porcentagem estabelecida na metodologia. Utilizando o conjunto treino, foi feita a seleção de descritores para o modelo, utilizando algoritmo genético configurado para selecionar 8 descritores para a elaboração do modelo¹⁸².

Os descritores selecionados foram avaliados quanto à correlação apresentada entre eles, onde foi estabelecido que estes deveriam possuir valores de correlação abaixo de 0,6. Como pode ser observado na Figura 3, não foram observados valores de correlação fora do desejado. Os descritores também foram avaliados quanto a sua multicolinearidade, estado em que há uma intercorrelação ou interassociação alta entre as variáveis independentes. Para isso, foi utilizado o fato de inflação de variância (VIF). Para não haver indicações de multicolinearidade, os valores de VIF devem ser iguais ou

inferiores a 10 (dez). Como pode ser observado na Tabela 2, não há indicação de multicolinearidade entre os descritores para este modelo¹³⁶.

Figura 3: Representação da matriz de correlação entre os descritores selecionados para o modelo NMDA.

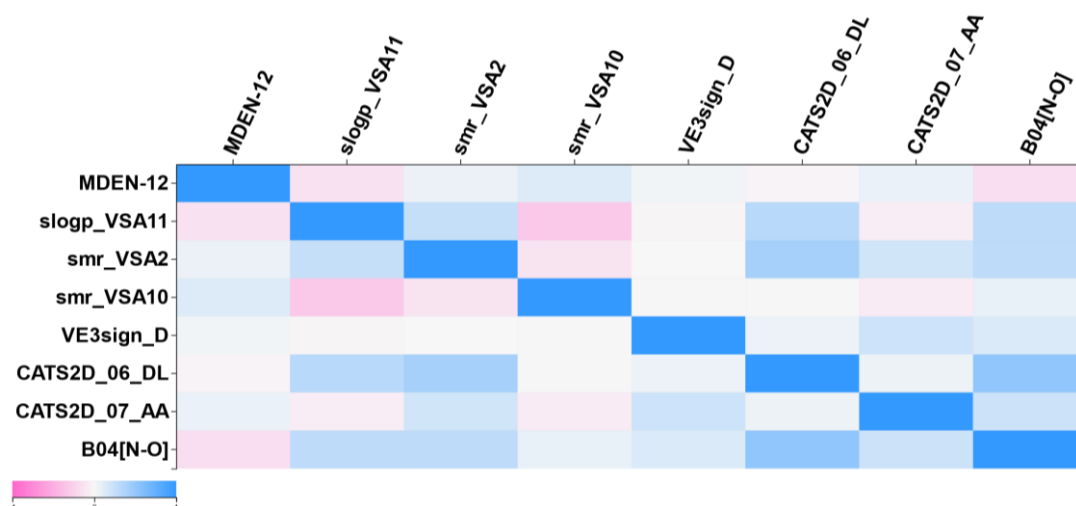


Tabela 2: Fatores de inflação de variância (VIF) em todas as variáveis numéricas para os descritores do modelo NMDA.

DESCRITOR	VIF	DESCRITOR	VIF
MDEN-12	1,41	CATS2D_07_AA	1,60
slogp_VSA11	1,40	CATS2D_06_DL	1,62
smr_VSA2	1,85	VE3sign_D	1,35
smr_VSA10	2,30	B04[N-O]	2,19

Fonte: Elaboração Própria.

Dentre os descritores selecionados pelo algoritmo genético para a elaboração do modelo, todos são descritores bidimensionais, dois deles, MDEN-12, VE3sign_D, são descritores do tipo topológico. Os descritores CATS2D_07_AA e CATS2D_06_DL são descritores do tipo farmacofórico. Os descritores slogp_VSA11, smr_VSA2 e smr_VSA10 são descritores de superfície molecular. Por fim, o descritor B04 [N – O] é um descritor de pares de átomos. Nos próximos parágrafos esses descritores serão abordados de forma mais clara quanto às características químicas que eles expressam.

O descritor MDEN-12 é um descritor calculado a partir da média da eletronegatividade dos átomos de nitrogênio presentes na molécula, ponderada pelas massas atômicas, com ênfase na margem de distância entre um nitrogênio primário e secundário¹⁸³. O descritor VE3sign_D representa a soma do coeficiente logarítmico do último autovetor da matriz de distâncias topológicas. Esta matriz representa as distâncias entre todos os pares de átomos na molécula¹⁸⁴.

Os descritores químicos smr_VSA2 e smr_VSA10 são descritores de área de superfície molecular que se baseiam na matriz de Burden modificada (MR). Essa matriz realiza o cálculo da contribuição de cada átomo em uma molécula para uma propriedade molecular e para uma medida aproximada de área de superfície molecular^{185,186}. No caso desses descritores, eles representam, respectivamente, a soma das áreas de superfície aproximadas de todos os átomos na molécula que possuem um valor de MR entre 1,29 e 1,82, e maior ou igual a 4,00.

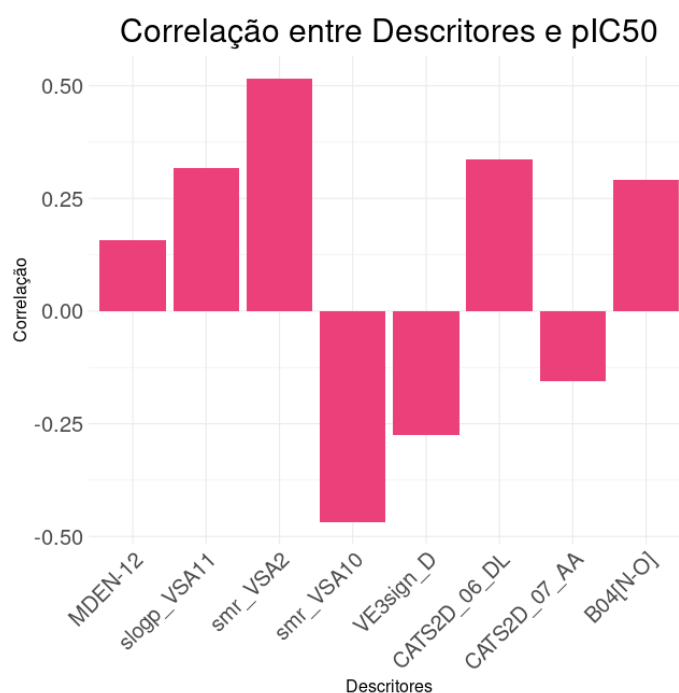
De forma semelhante, o descritor slogp_VSA11 também representa a soma das áreas de superfície aproximadas, mas, neste caso, é levado em consideração o coeficiente de partição octanol/água (SLogP), onde são analisados todos os átomos na molécula que possuem um valor de SlogP entre 0,50 e 0,60. Quanto ao descritor de pares de elétrons, o descritor B04[N-O] representa o quarto autovalor da matriz de Burden modificada, considerando apenas as ligações entre átomos de nitrogênio e oxigênio^{185,186}.

Quanto aos descritores farmacofóricos, o descritor CATS2D_07_AA é calculado a partir de um método de busca de padrões químicos avançados, que traduz a frequência de dois átomos doadores de ligação de hidrogênio a uma distância topológica de 7 na molécula. De forma semelhante, o descritor CATS2D_06_DL representa a contagem de pares de átomos do tipo doador de ligação de hidrogênio e lipofílico que estão separados por uma distância topológica de 6 ligações na molécula^{184,187}.

Dentre os descritores selecionados, é possível destacar alguns, como o descritor MDEN-12. O fato desse descritor estar positivamente relacionado à

atividade, como pode ser observado na Figura 4, destaca a importância de compostos nitrogenados para a atividade no receptor em questão. Essa importância é confirmada por artigos que apontam a relevância desse grupamento tanto para a inibição incompetitiva quanto seletiva desses receptores, a exemplo da memantina, composto nitrogenado que atua inibindo-o^{188–190}. Outro descritor também associado à presença de grupos nitrogenados na molécula é o B04 [N-O], positivamente associado à atividade, segundo apontado pelo modelo.

Figura 4: Correlação entre os descritores selecionados para o modelo NMDA e a atividade observada (pIC50).



Fonte: Elaboração Própria.

Uma vez que os descritores foram analisados, foi possível iniciar o processo de construção do modelo. Neste processo foram testados três algoritmos para a elaboração de modelo, objetivando identificar aquele que melhor se adequa aos dados. Foram elaborados modelos de regressão linear, regressão do tipo PACE, redes neurais artificiais do tipo “*Multilayer Perceptron*” com *backpropagation* (MLP) e máquina de suporte de vetores (SVM), todos implementados no Weka.

Durante o processo de elaboração dos modelos lineares, foram utilizados os padrões de configuração pre-estabelecidos contidos no Knime.

Dentro desses parâmetros, também foi observado aquele que apresentava melhor resultado. Para os modelos não lineares, foram testados os conjuntos de configurações permitidos pelo nó do Weka, a partir de modificações necessárias. Na Tabela 3 estão os resultados para o coeficiente de determinação e RMSE do treino e do teste e a validação cruzada para cada um dos modelos.

Tabela 3: Resultados obtidos para os modelos elaborados para o receptor NMDA.

MODELOS	TREINO		TESTE		VALIDAÇÃO CRUZADA
	R ²	RMSE	R ²	RMSE	Q ² - LOO
Regressão Linear	0,722	0,463	0,443	0,618	0,632
PACE	0,653	0,517	0,453	0,612	0,615
MLP	0,732	0,454	0,654	0,487	0,533
SVM	0,687	0,491	0,521	0,573	0,412

Fonte: Elaboração Própria.

Para a obtenção dos modelos de regressão linear foi utilizado o parâmetro “M5 *method*”. Esse nó utiliza o critério de Akaike para a seleção de modelos, mantendo a complexidade do modelo a mais baixa possível. O método selecionado percorre os atributos removendo aquele com o menor coeficiente normalizado até não ser observada qualquer melhoria na estimativa do erro dada pelo critério de informação de Akaike. O modelo linear do tipo PACE foi obtido utilizando o estimador PACE6, que estima os efeitos das variáveis a partir dos dados e sua utilização para melhorar a modelagem^{143,144}.

Os modelos não lineares foram obtidos através das modificações nos parâmetros de configuração dos nós fornecidos pelo Weka. Para o modelo MLP, foram testados os seguintes parâmetros: número de camadas ocultas (-H) variando entre 1 e 20, taxa de aprendizagem (-L), com valores entre 0,001 e 1, taxa de *momentum* (-M), com valores entre 0,001 e 1, tempo de treino (-N), com valores entre 1 e 1000 e seed (-S) com valores entre 1 e 2000. Tendo em vista esses intervalos, o conjunto de configurações utilizado para obter o

resultado observado na Tabela 3 foi: H = 2; L = 0,18; M = 0,257; N = 3520 e S = 409^{148,149}.

Para o modelo SVM também foram testadas configurações, que consideravam os parâmetros: “cost” (-C), gamma (-G), eps (-E), coef0 (-R) e “degree” (-D). O conjunto de configurações utilizadas para chegar no melhor modelo foi: C = 0,995; G = 0,885; E = 0,801; R = 1 e D = 3 utilizando o nu-SVR um tipo de SVM próprio para regressão com um kernel linear, para a obtenção desses resultados.

4.2. Modelo NChR

O banco selecionado para este modelo, ChEMBL2492, possui ao todo 3510 compostos. A atividade biológica foi avaliada por meio dos valores de concentração necessários para produção do efeito máximo (EC50). O banco foi exportado para o software KNIME *Analytics*, onde foram mantidas apenas as estruturas com valores de atividade expressos em EC50. Adicionalmente, foram excluídos aqueles compostos que apresentavam informações incompletas ou estavam duplicados. Sendo assim, ao final desse processo, o banco resultante continha 516 compostos, que seriam utilizados para a elaboração do modelo.

De forma semelhante ao que foi realizado para a elaboração do modelo NMDA, as estruturas químicas foram normalizadas e redesenhadas. Foram adicionados os hidrogênios e geradas as estruturas 3D, todo esse processo foi realizado seguindo o mesmo padrão lógico estabelecido para o modelo anterior.

Tendo em vista que este é um banco que pode ser considerado extenso e as atividades são determinadas de formas diversas, optou-se por restringir as estruturas cujas atividades foi determinada usando ensaios com base nas características biológicas e/ou químicas do sistema experimental utilizado (BAO_0000019), resultando em 121 para a elaboração do modelo.

Tendo em vista que todos os modelos elaborados objetivam identificar compostos promissores em bancos de alcaloides, seguiu-se o mesmo fluxo de

trabalho anteriormente descrito, onde o banco de compostos testados no receptor NACHR foi analisado quanto à similaridade com o banco de alcaloides. Por meio do coeficiente de Tanimoto, foram mantidas aquelas estruturas que apresentaram maiores semelhanças, resultando em um banco com 100 compostos.

Seguindo o fluxo de trabalho preestabelecido é feito o cálculo de descritores, novamente foram calculados 7974 descritores, incluindo descritores 2D e 3D. Esses descritores foram filtrados a fim de excluir os que possuíam erros ou não foram calculados. Os descritores resultantes foram normalizados e filtrados quanto à variância e correlação, como definido anteriormente, resultando em um total de 265 descritores.

Ao realizar os testes com modelos lineares para avaliar qual apresenta melhor desempenho para a seleção dos descritores de maior colaboração para a determinação da atividade das estruturas químicas, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4. Observou-se que o modelo de melhor desempenho foi o Random Forest, por meio dele foi possível reduzir a quantidade de descritores para 18 descritores.

Tabela 4: Resultados dos modelos obtidos para cada algoritmo.

ALGORITMOS	R ²	RMSE
RANDOM FOREST	0,961	0,06
LASSO	0,943	0,056
PLS	0,726	0,117
GBM	0,938	0,056
GLMBOOST	0,946	0,053
XGBOOST	0,899	0,152

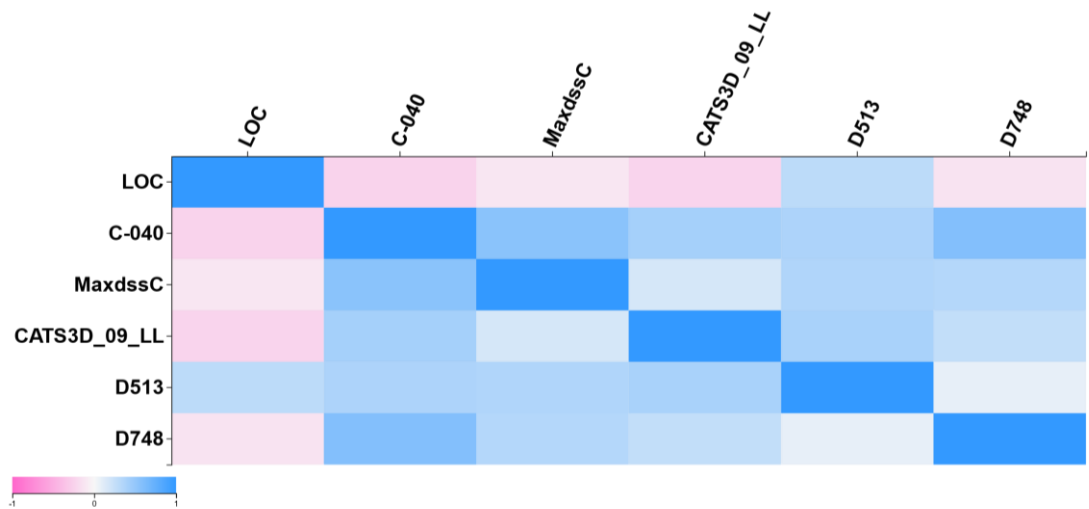
Fonte: Elaboração Própria.

O banco foi então estratificado em treino, com 80 substâncias, e conjunto teste, com 20 substâncias, seguindo a porcentagem estabelecida na

metodologia. Utilizando o conjunto treino foi feita a seleção de descritores para o modelo, utilizando o nó “R Snippet” configurado para selecionar 6 descritores para a elaboração do modelo.

Os descritores selecionados foram avaliados quanto à correlação entre eles, onde se estabeleceu valores de correlação abaixo de 0,6. Como pode ser observado na Figura 5, não foram observados valores de correlação fora do desejado. Os descritores também foram avaliados quanto à sua multicolinearidade, estado em que há uma intercorrelação alta entre as variáveis independentes. Para isso foi utilizado o fato de inflação de variância (VIF), para não haver indicações de multicolinearidade, os valores de VIF devem ser iguais ou inferiores a 10. Como pode ser observado na Tabela 5, não há indicação de multicolinearidade entre os descritores para este modelo.

Figura 5: Representação da matriz de correlação entre os descritores selecionados para o modelo NACHR.



Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 5: Fator de inflação de variância (VIF) em todas as variáveis numéricas do modelo NACHR.

DESCRITOR	VIF	DESCRITOR	VIF
LOC	2,01	CATS3D_09_LL	1,69
C-040	2,61	D513	2,05
MaxdssC	1,79	D748	1,92

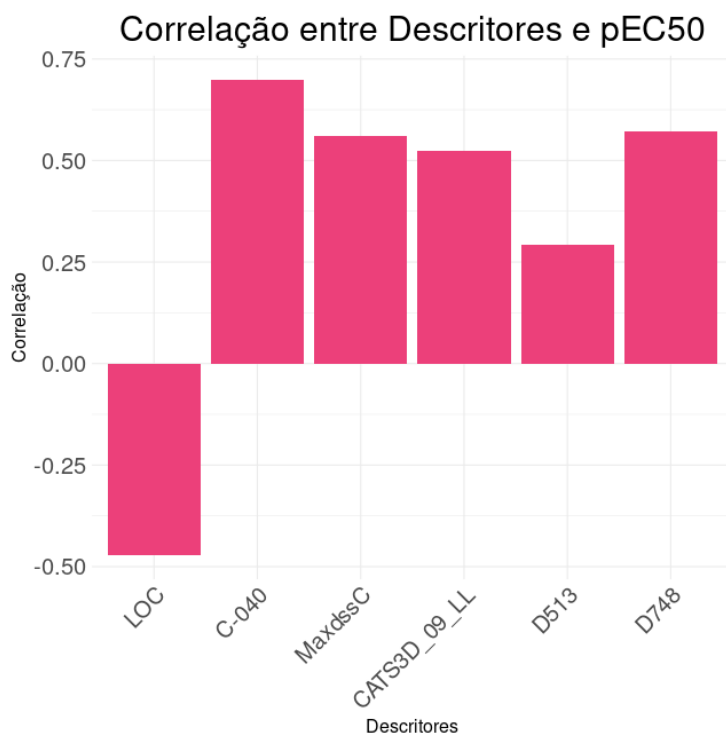
Fonte: Elaboração Própria.

Uma boa parte dos descritores selecionados pelo modelo são do tipo topológico ou eletrotológico. Os descritores LOC e D513 são descritores topológicos. O primeiro refere-se ao *Lopping Centric Index* e representa o índice utilizado para medir o grau de ramificação molecular, por meio dele também é possível quantificar a compacticidade da molécula, refletindo a superfície e a simetria da estrutura molecular bidimensional. O segundo está associado ao índice de carga topológica molecular de ordem 3, que mede a distribuição de carga em uma molécula. Ele é calculado considerando a transferência de carga entre pares de átomos que estão conectados por uma cadeia de três átomos^{191,192}.

Os descritores C-040 e D748 são descritores associados à presença de átomos eletronegativos na estrutura. C-040 é um descritor topológico que identifica e quantifica a presença de três tipos diferentes de grupos funcionais: "R-C(=X)-X / R-C#X / X=C=X" que possuem em comum a presença da ligação de um átomo eletronegativo (X) ao carbono. O descritor D718 sinaliza o número do grupo H ligado a C0 (sp3) com 1X ligado ao próximo C, e refere-se à contagem de átomos de hidrogênio ligados a um átomo de carbono com hibridação tetraédrica, onde há exatamente um átomo eletronegativo ligado ao carbono adjacente¹⁹².

O descritor MaxdssC é um descritor eletrotológico (*E-State*), que mede a capacidade eletrônica e topológica de um átomo específico em uma molécula. Neste caso, esse índice é calculado para átomos de carbono duplamente ligados e considera tanto a quantidade de elétrons de valência quanto a acessibilidade estérica do átomo. Por fim, o descritor CATS3D_09_LL é um descritor 3D baseado em farmacóforos usado para descrever a interação entre grupos lipofílicos (hidrofóbicos) na molécula, a uma distância topológica entre eles 9 e 10 Å¹⁹².

Figura 6: Correlação entre os descritores selecionados para o modelo NACHR e a atividade observada (pEC50).



Fonte: Elaboração Própria.

Considerando os descritores selecionados em conjunto com a análise da correlação desses descritores com a atividade, que pode ser vista na Figura 6, é possível destacar alguns desses descritores, a exemplo do C-040 e D784. Esses descritores, como já foi referido, estão associados à presença de átomos eletronegativos na molécula, como, por exemplo, o nitrogênio e o oxigênio. Haja vista a importância amplamente descrita da presença desses átomos nos agonistas do receptor em questão, bem como sua presença no ligante natural do alvo, a escolha desses descritores e a contribuição positiva que eles apresentam reforçam a capacidade do algoritmo utilizado para identificar descritores importantes para a atividade^{193–196}.

Outro ponto importante a ser destacado é a seleção do descritor LOC, que contribui negativamente para a atividade. Esse descritor está associado ao grau de ramificação da molécula, sua contribuição é confirmada pelo conhecimento que há na literatura acerca do comportamento dos agonistas nesse alvo, onde o tamanho e o volume do ligante está diretamente associado à atividade que este apresentará no alvo^{197,198}.

Da mesma forma como foi desenvolvido para o receptor NMDA, os descritores selecionados foram utilizados para os testes de elaboração de modelos de predição de atividade. Utilizando os mesmos algoritmos anteriormente citados, os resultados desses testes estão descritos na Tabela 6. Foi observado que, dentre os modelos elaborados, apenas os modelos não lineares, MLP e SVM, foram os que apresentaram maiores valores de R^2_{TESTE} .

O conjunto de configurações utilizado para obter o resultado obtido no modelo MLP foi: H = 3,4; L = 0,19; M = 0,6; N = 379 e S = 1757. Para o modelo SVM, o conjunto de configurações utilizados para chegar no melhor modelo foi: C = 0,921; G = 0,382; E = 0,19; R = 0,036 e D = 1, utilizando o nu-SVR, um tipo de SVM próprio para regressão com um kernel sigmoide, para a obtenção desses resultados.

Tabela 6: Resultados para os modelos elaborados para o receptor NACHR.

MODELOS	TREINO		TESTE		VALIDAÇÃO CRUZADA
	R ²	RMSE	R ²	RMSE	Q ² - LOO
Regressão Linear	0,729	0,117	0,703	0,152	0,673
PACE	0,725	0,117	0,712	0,15	0,701
MLP	0,751	0,112	0,861	0,104	0,672
SVM	0,613	0,138	0,833	0,114	0,628

Fonte: Elaboração Própria.

4.3. Modelo AChE

O banco selecionado para esse modelo, ChEMBL220, possui ao todo 8832 compostos. A atividade biológica foi avaliada por meio dos valores de concentração para produção do efeito inibitório máximo (IC₅₀). O banco foi exportado para o *software* KNIME *Analytics* onde foram mantidas apenas as estruturas com valores de atividade expressos em IC₅₀. Foram excluídos aqueles compostos que apresentavam informações incompletas ou estavam duplicados, sendo assim, ao final desse processo o banco resultante possuiu 5388 compostos.

Com um banco tão extenso, criar um modelo de predição de atividade, considerando a presença de diversas formas experimentais de determinação de atividade, torna-se complexo. Desta forma, optou-se por restringir as estruturas cujas atividades foram determinadas usando ensaios com base nas características biológicas e/ou químicas do sistema experimental utilizado (BAO_0000019), resultando em 389 compostos utilizados para a elaboração do modelo.

Seguindo o fluxo de trabalho preestabelecido, foi realizado o cálculo dos descritores. Novamente, foram calculados 7.974 descritores, seguindo o mesmo processo de exclusão de estruturas sem as informações necessárias, normalização e realização dos filtros de variância e correlação, resultando em um total de 215 descritores.

Na realização dos testes com modelos lineares, visando identificar quais modelos apresentam melhor desempenho na seleção dos descritores mais relevantes para a determinação da atividade das estruturas químicas no banco de dados, os resultados de desempenho de cada um dos algoritmos estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados dos modelos lineares para cada algoritmo para o modelo AChE.

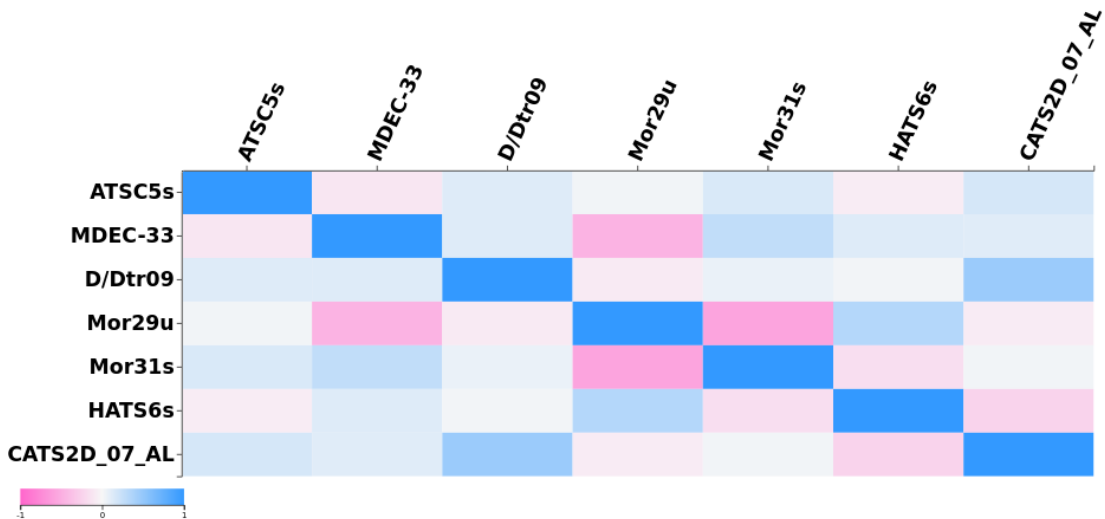
ALGORITMOS	R ² _{TESTE}	RMSE
GLMBOOST	0,83	0,56
RANDOM FOREST	0,96	0,3
PLS	0,97	0,2
XGBOOST	0,99	0,013
LASSO	0,84	0,55
GBM	0,95	0,28

Fonte: Elaboração Própria.

Analisando os resultados optou-se pela escolha do algoritmo com melhor resultado, no caso, o XGBOOST. Utilizando este algoritmo, 34 descritores foram classificados como importantes para a atividade, novamente o banco foi estratificado em treino e teste, seguindo os mesmos critérios dos outros modelos desenvolvidos. Neste caso ao treino composto por 172 substâncias e o teste por 43 substâncias. O conjunto treino foi utilizado para selecionar 7 descritores utilizados para o desenvolvimento dos modelos.

Novamente os descritores foram avaliados quanto à correlação entre si e quanto à multicolinearidade entre eles, descritos através dos valores de inflação, VIF. Os resultados dessas análises estão apresentados na Figura 7 e na Tabela 8.

Figura 7: Representação da matriz de correlação entre os descritores selecionados para o modelo AChE.



Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 8: Fator de inflação de variância (VIF) em todas as variáveis numéricas do modelo AChE.

DESCRITOR	VIF	DESCRITOR	VIF
ATSC5s	1,42	MDEC-33	2,12
D/Dtr09	1,44	Mor29u	2,61
Mor31s	1,67	HATS6s	1,58
CATS2D_07_AL	1,71		

Fonte: Elaboração Própria.

Quanto aos descritores selecionados, há certa diversidade quanto às características apontadas como relevantes para a molécula. O descritor MDEC-33 é um descritor topológico que aponta a distância molecular entre todos os carbonos terciários da molécula. Enquanto o descritor D/Dtr09, também topológico, é usado para medir a complexidade estrutural e a conectividade dos anéis moleculares, considerando a distância e o caminho deturpado entre átomos dentro de anéis de ordem 9.

O descritor HATS6s é um descritor do tipo GETAWAY, esses são descritores moleculares desenvolvidos para codificar informações sobre a geometria molecular, topologia e pesos atômicos, capazes de capturar diversas informações como: tamanho, forma, conectividade de átomos e grupos funcionais, considerando a organização tridimensional da molécula e suas interações. Especificamente, o HATS6s adota uma abordagem holística para descrever características químicas específicas de um alvo, calculando a autocorrelação entre propriedades moleculares com um intervalo de 6 unidades. A ponderação dos resultados desse cálculo é realizada considerando-se a influência de cada observação, bem como o estado eletrotológico da molécula^{184,199}.

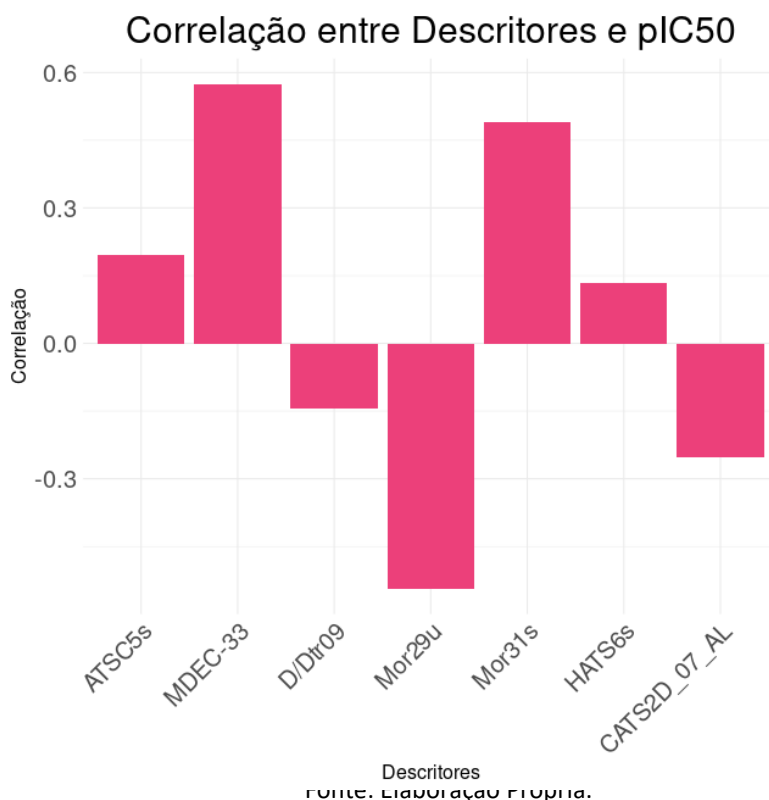
O descritor ATSC5s é um descritor de autocorrelação topológica, no caso específico deste descritor é feita uma ponderação usando como base o estado I (I-State), que nada mais é do que um estado eletrotológico, baseado na contribuição estrutural e eletrônica individual de cada átomo utilizando uma distância topológica de 5^{200,201}.

Os descritores Mor29u e Mor31s são descritores 3D do tipo MoRSE. Esses descritores são gerados a partir de mapas de densidade eletrônica tridimensionais e descrevem a distribuição dessa densidade ao redor de cada átomo. Para o Mor29U é considerado um parâmetro de dispersão igual 28 e esse cálculo é feito se, ponderações. Por sua vez, no descritor Mor31s o parâmetro de dispersão é igual a 30 e o resultado é ponderado pelo I-State²⁰².

Por fim, o descritor CATS2D_07_AL pertence à família de descritores CATS2D, responsáveis por capturar informações bidimensionais das

moléculas, sua estrutura e interações. Esse descritor em específico mede a presença e a distribuição espacial de interações entre aceptores de ligação de hidrogênio e grupos lipofílicos a uma distância de 7 unidades topológicas.

Figura 8: Correlação entre os descritores selecionados para o modelo AChE e a atividade observada (pIC50).



Outro fato a ser analisado é como esses descritores contribuem positiva ou negativamente para a atividade, como pode ser visto na Figura 8. A contribuição positiva para a atividade do descritor MDEC-33 é de grande relevância uma vez que carbonos terciários são frequentemente encontrados na estrutura de inibidores da AChE, podendo auxiliar na seletividade de compostos para essa enzima ou contribuir para a potência desses compostos^{203,204}.

De forma semelhante, descritores como o CATS2D_07_AL destacam a importância da presença e posicionamento de grupamentos como aceptores de hidrogênio e grupos lipofílicos na molécula. Essa importância é confirmada por relatos da literatura que mostram o papel de grupamentos capazes de realizar pontes de hidrogênio com resíduos específicos da enzima, aumentando a potência de inibição^{205,206}. De forma semelhante, os grupamentos lipofílicos têm

sido apontados como vitais para uma boa atividade inibitória na molécula^{203,207,208}.

Da mesma forma como foi desenvolvido para os demais alvos, os descritores selecionados foram utilizados para os testes de elaboração de modelos de predição de atividade, utilizando os mesmos algoritmos citados. Os resultados desses testes estão descritos na Tabela 9. Foi observado que dentre os modelos elaborados, os modelos não lineares, MLP e SVM, apresentaram os maiores valores de R^2_{TESTE} .

O conjunto de configurações utilizado para obter o resultado obtido no modelo MLP foi: $H = 2$; $L = 0,083$; $M = 0,845$; $N = 37$ e $S = 1425$. Para o modelo SVM, o conjunto de configurações utilizados para melhor modelo foi: $C = 0,999$; $G = 91$; $E = 0,862$; $R = 1,994$ e $D = 1$, utilizando o SVM epsilon-SVR, próprio para análises de regressão com o kernel de função de base radial (RBF).

Tabela 9: Resultados obtidos para os modelos elaborados para o receptor AChE.

MODELOS	TREINO		TESTE		VALIDAÇÃO CRUZADA
	R^2	RMSE	R^2	RMSE	$Q^2 - \text{LOO}$
Regressão Linear	0,697	0,735	0,807	0,705	0,666
PACE	0,697	0,735	0,807	0,705	0,666
MLP	0,65	0,791	0,872	0,574	0,605
SVM	0,727	0,698	0,848	0,625	0,678

Fonte: Elaboração Própria.

4.4. Escolha e Validação do Modelo

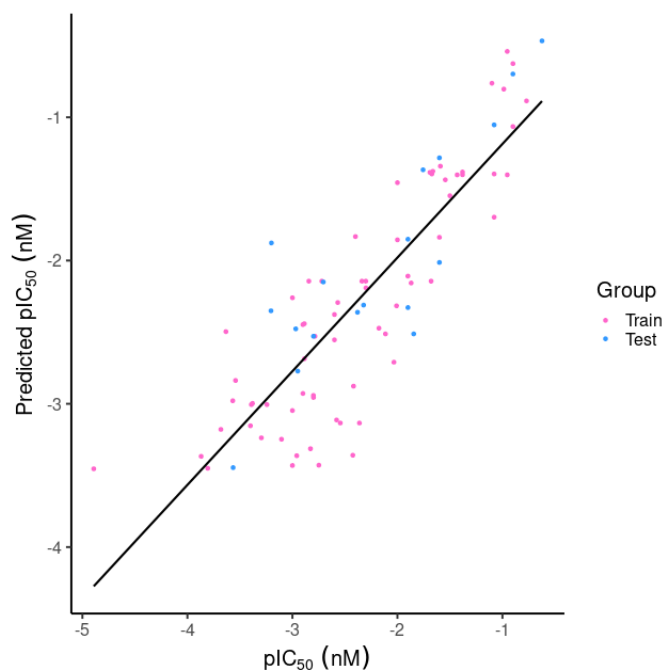
Como pôde ser observado nas sessões anteriores, mais de um modelo de previsão de atividade foi desenvolvido para cada um dos alvos moleculares abordados. O melhor modelo para cada situação foi selecionado utilizando os critérios estatísticos complexos do nó “*Model Acceptability Criteria*” do Enalos, como descrito na metodologia, a fim de garantir a robustez do modelo.

Para o modelo ser considerado válido, ele deve obedecer aos seguintes parâmetros: $q^2 > 0,5$; $R^2 > 0,6$; $R^2_{ext} > 0,5$; $(R^2 - R^2_0)/R^2 < 0,1$ e $0,85 \leq k \leq 1,15$ ou $(R^2 - R'^2_0)/R^2 < 0,1$ e $0,85 \leq k' \leq 1,15$ ¹⁶³. Ao analisar cada um dos modelos elaborados, foi escolhido como melhor modelo aquele com maior R^2_{TESTE} e menor RMSE. Além disso, também foi considerado a validação feita pelo Y-Randômico, onde o valor de R^2_{TESTE} para o teste obtido por meio da randomização deve ser menor do que o valor obtido para o modelo, a fim de garantir que o modelo não seja aleatório.

Para o alvo NMDA, o modelo de melhor desempenho geral e na validação foi o obtido por meio do MLP. Este modelo apresentou valor de $R^2 = 0,732$ e $R^2_{TESTE} = 0,654$. Quanto aos valores analisados pelo nó do Enalos, todos se apresentaram na conformidade para os parâmetros estabelecidos na metodologia, como pode ser visto na Tabela 10.

Na Figura 9 é possível visualizar o gráfico de dispersão que mostra a relação entre os valores preditos pelo modelo (pIC_{50}) e os valores de atividade experimentais de pIC_{50} . Por meio da análise do gráfico, é possível concluir que os pontos estão distribuídos de maneira uniforme ao longo da linha, para os dados de ambos os grupos, treino e teste, corroborando com o elucidado pelo R^2 e RMSE obtidos para o modelo.

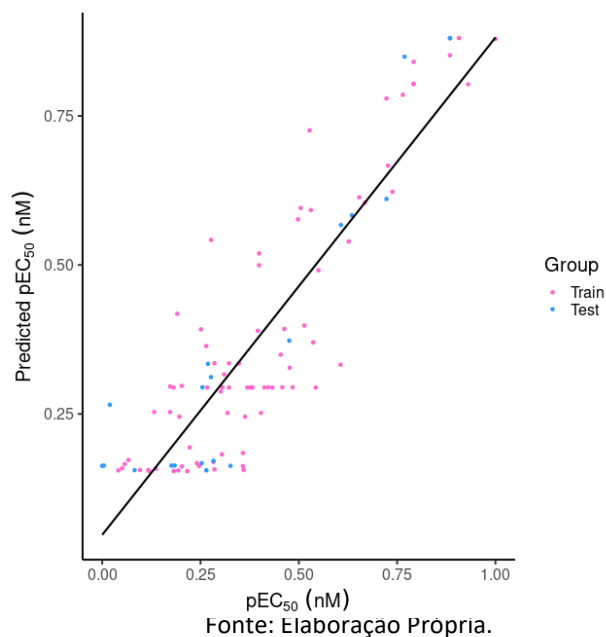
Figura 9: Gráfico de dispersão de pontos entre a atividade experimental e prevista para o modelo QSAR do receptor NMDA.



Fonte: Elaboração Própria.

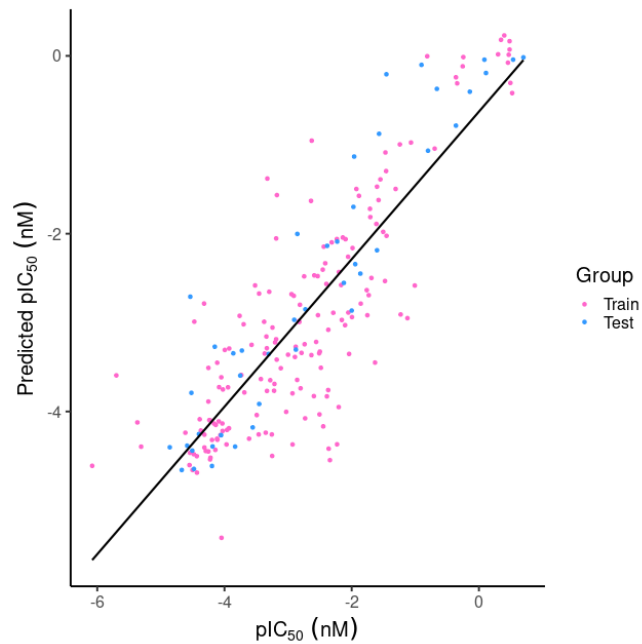
Para o modelo elaborado para o alvo NACHR, o modelo de melhor desempenho foi o obtido utilizando o MLP, o valor de $R^2 = 0,751$ e $R^2_{\text{TESTE}} = 0,861$. Os resultados da validação podem ser visualizados na Tabela 10. Novamente, o modelo foi utilizado para a elaboração de um gráfico de dispersão que elucidasse o seu desempenho. Como pode ser visto na Figura 10, ambos os grupos aparentam ter boa correlação com a linha de regressão, indicando bom funcionamento do modelo.

Figura 10: Gráfico de dispersão de pontos entre a atividade experimental e prevista para o modelo QSAR do receptor NACHR.



Por fim, o melhor modelo obtido para o alvo AChE e que também está conforme com esses critérios de validação foi obtido por MPL, com valores de $R^2 = 0,65$ e $R^2_{\text{TESTE}} = 0,872$. Novamente, um gráfico de dispersão foi obtido e pode ser visualizado na Figura 11, onde é possível observar que a distribuição dos pontos aponta para uma boa capacidade preditiva do modelo, uma vez que os pontos estão dispersos uniformemente pela linha.

Figura 11: Gráfico de dispersão de pontos entre a atividade experimental e prevista para o modelo QSAR da enzima AChE.



Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 10: Resultados obtidos para a validação para os melhores modelos obtidos para os alvos estudados.

Model Acceptability Criteria				
CRITÉRIOS	Referência	NMDA	NACHR	AChE
R^2	>0,6	0,71	0,861	0,874
R^2_{ext}	>0,5	0,671	0,862	0,874
$(R^2 - R'^2_0)/R^2$	<0,1	0,04	0,023	0,002
$abs(R_0^2 - R'^2_0)$	<0,1	0,096	0,019	0,003
K	$0,85 < k < 1,15$	0,012	1,002	1,004
R^2_{TESTE} da randomização	< R^2	0,161	-0,117	-0,214

Fonte: Elaboração Própria.

4.5. Triagem Virtual

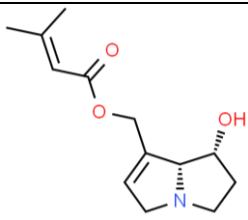
Uma vez que os modelos foram avaliados quanto a sua validade, capacidade preditiva e robustez, eles foram aplicados ao banco de compostos contendo alcaloides e compostos nitrogenados. O banco possui um total de

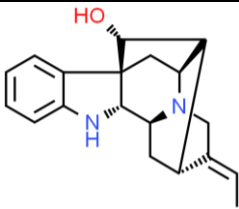
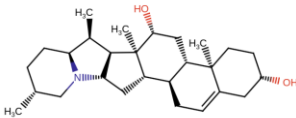
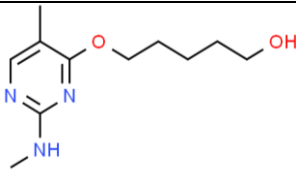
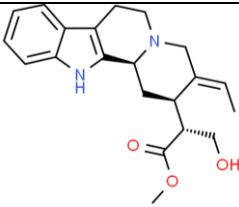
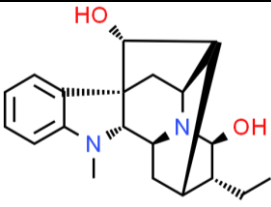
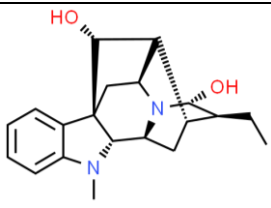
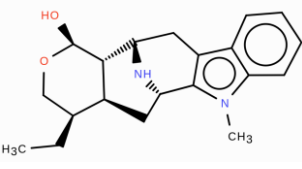
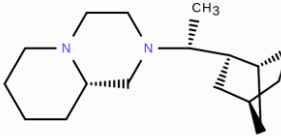
2569 estruturas descritas com as informações necessárias para a sua identificação. O banco utilizado para a triagem foi preparado da mesma forma que o banco de estrutura utilizado para a elaboração do modelo, foram geradas as estruturas 3D seguindo o mesmo protocolo. Essas estruturas foram utilizadas para o cálculo de descritores, da mesma forma descrita anteriormente.

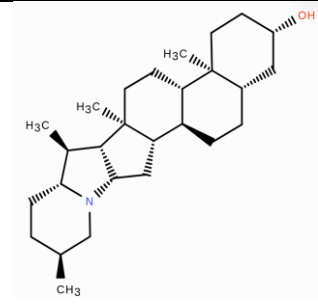
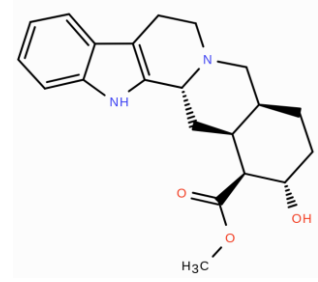
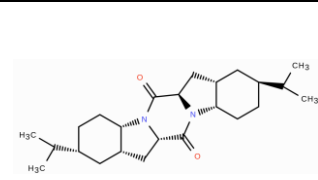
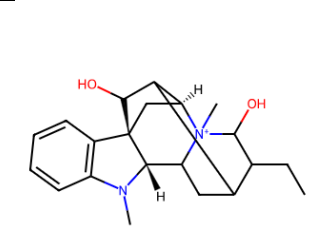
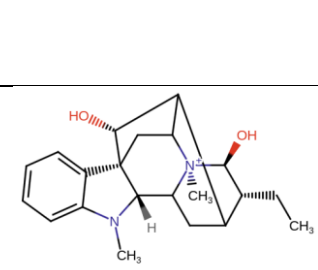
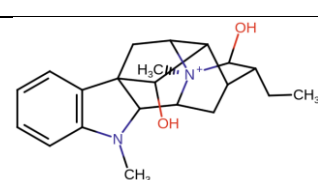
Uma vez que os descritores foram calculados, eles foram normalizados utilizando os mesmos parâmetros de normalização estabelecidos para a elaboração do modelo. Feito isso, são selecionados somente os descritores escolhidos para o modelo. Foi definido o domínio de aplicabilidade do modelo criado, dessa forma é possível definir o espaço físico-químico e estrutural no qual o modelo está contido e é válido com base no conjunto de compostos utilizados para o seu desenvolvimento^{209,210}.

O método utilizado para a definição do domínio de aplicabilidade dos modelos elaborados foi por meio da utilização do nó disponibilizado pelo Enalos “*Domain – Similarity*”. Esse nó utiliza a comparação das estruturas químicas com base nas distâncias euclidianas para identificar as estruturas químicas mais semelhantes às utilizadas para a elaboração do modelo^{160,161}. Para os resultados da triagem virtual obtidos também foi realizado um filtro a fim de manter como promissores apenas aqueles compostos que estavam aptos a atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), usando a plataforma SwissADME (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Suíça)²¹¹.

Tabela 11: Compostos classificados com maior probabilidade de atividade no receptor NMDA segundo o modelo elaborado.

COMPOSTO	CÓDIGO	ESTRUTURA	pIC50
9-Senecioil Retronecina	CAS1231		-0,014

Nortetrafilicina	CAS411		-0,15
(1S,2R,7S,10R,11S,13R,14S,15R,16S,17R,20R,23S)-10,14,16,20-tetramethyl-22-azahexaciclo[12.10.0.0 ^{2,11} .0 ^{5,10} .0 ^{15,23} .0 ^{17,22}]tetracos-4-ene-7,13-diol	CAS948		-0,566
5-[[5-Metil-2-(metilamino)-4-pirimidinil]oxi]-1-pentanol	1699318-94-9		-0,639
Isositsirikina	CAS1331		-0,64
Isoajmalina	CAS387		-0,658
Isosandwicina	CAS399		-0,658
Isoraumaclina	CAS491		-0,670
2-(1-Biciclo[2.2.1]hept-2-ilethil)octahidro-2H-pirido[1,2-a]pirazina	1559494-85-7		-0,722

Demissidina	CAS951		-0,767
3-epi- α -yohimbina	CAS457		-0,874
(1S,4S,7R,9S,11S,14S,17R,19S)-7,17-Diisopropil-3,13-diazapentaciclo[11.7.0.0 ^{3,11} .0 ^{4,9} .0 ^{14,19}]icosano-2,12-diona	2764663-26-3		-0,882
Nb-Metilajmalina	CAS388		-0,947
Nb-Metilisoajmalina	CAS393		-0,947
Nb-Metilisandwicina	CAS402		-0,947

Fonte: Elaboração Própria.

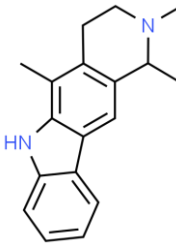
Analisando os valores de pIC₅₀ obtidos, algo que é necessário destacar é que os 15 compostos citados possuem valores de pIC₅₀ próximos aos compostos tidos como ativos nesse mesmo receptor. Esses compostos

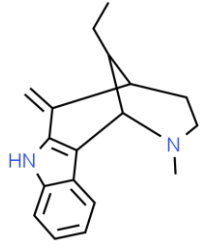
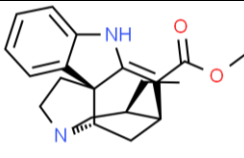
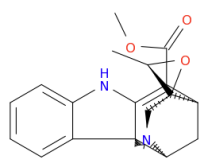
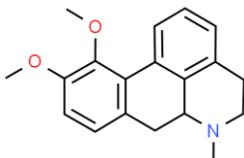
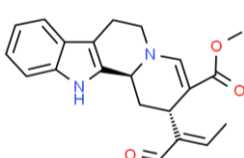
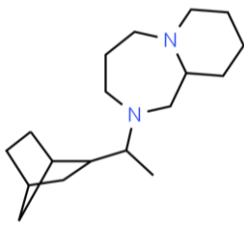
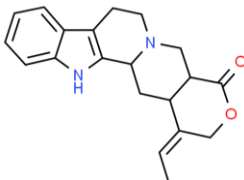
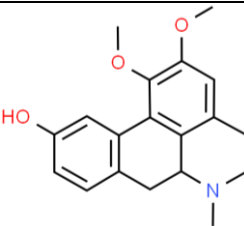
estavam contidos no banco utilizado para a elaboração do modelo. Por exemplo, o Ifenprodil (ChEMBL305187) e o EVT-101 (ChEMBL3545350) possuem valores de pIC50 de -1,079 e -1,679, respectivamente, utilizando a mesma unidade como parâmetro, nanomolar (nM).

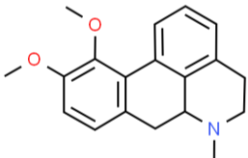
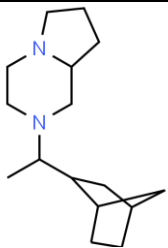
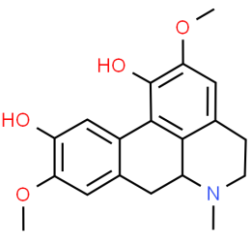
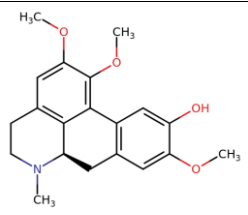
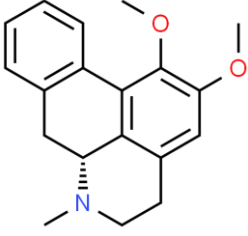
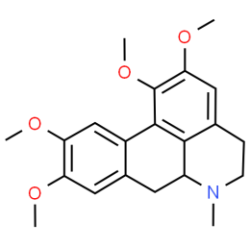
Dentre esses compostos, outro ponto a se destacar é que em sua maioria foram selecionados alcaloides do tipo indólico. Essa classe de alcaloides é amplamente apontada na literatura como opções terapêuticas promissoras no tratamento da DA, com capacidade de inibir a produção de proteínas anômalas, bem como sua ação neuroprotetiva. Além disso, muitos dos alcaloides selecionados são semelhantes a ajmalicina, que possui estudos frente à atividade em enzimas associadas à doença de Alzheimer^{129,212–214}.

Seguindo o mesmo processo de trabalho, o banco de alcaloides foi novamente submetido ao domínio de aplicabilidade, mas desta vez para o modelo NACHR, por meio do qual 1126 estruturas foram consideradas parte do espaço químico do modelo utilizadas para a triagem utilizando o modelo elaborado. Foram avaliados os valores de atividades expressos em pEC50 (nM) preditos pelo modelo e selecionados os 15 compostos mais ativos segundo o modelo, estes estão listados com suas estruturas 2D e atividade preditas na Tabela 12.

Tabela 12: Compostos classificados com maior probabilidade de atividade no receptor NACHR segundo o modelo elaborado.

COMPOSTO	CÓDIGO	ESTRUTURAS	pEC50
Guatambuina	CAS1289		0,874

Uleina	CAS1287		0,857
19,20-Diidroacummicina	CAS482		0,851
19 α ,20 α - Epoxiacuammicina	CAS481		0,847
10,11-Dimetoxi-6-metil-5,6,6a,7-tetraidro-4H-dibenzo[de,g]quinolina	18605-42-0		0,835
Vallesiacotamina	CAS578		0,833
2-[1-(Biciclo[2.2.1]hept-2-il)etil]decahidropirido[1,2-a][1,4]diazepina	1559312-72-9		0,824
Vallesiacotamina lactona	CAS579		0,823
1,2-Dimetoxi-6-metil-5,6,6a,7-tetraidro-4H-dibenzo[de,g]quinolin-10-ol	6874-94-8		0,821

10,11-Dimetoxi-6-metil-5,6,6a,7-tetrahidro-4H-dibenzo[de,g]quinolina	38291-33-7		0,82
2-[1-(Biciclo[2.2.1]hept-2-il)etil]octa-hidropirrolo[1,2-a]pirazina	1559808-54-6		0,813
2,9-Dimetoxi-6-metil-5,6,6a,7-tetrahidro-4H-dibenzo[de,g]quinolina-1,10-diol	25651-04-1		0,813
1,2,9-trimetoxi-6-metil-5,6,6a,7-tetrahidro-4H-dibenzo[de,g]quinolin-10-ol	6683-29-0		0,81
Nuciferina	5868-18-8		0,805
Glaucina	38325-02-9		0,802

Fonte: Elaboração Própria.

Seguindo o mesmo raciocínio utilizado também foram analisadas as estruturas químicas presentes no banco utilizado para a elaboração do modelo. Compostos como a própria acetilcolina, nicotina e a tropisetrona, cuja atividade já foi relatada no NACHR, apresentavam valores de pEC50 (nM) de -4,079, -

4,742 e -3,114, respectivamente^{215,216}. Ao analisar os valores de pEC50 obtidos pelo modelo podemos perceber que todas as estruturas químicas selecionadas apresentam valores de atividade acima destes citados, aumentando assim a probabilidade de que esses compostos apresentam real atividade no receptor.

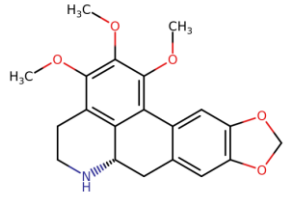
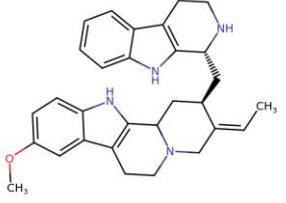
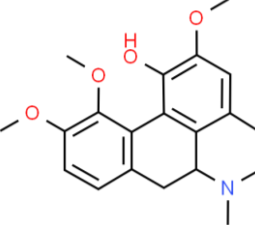
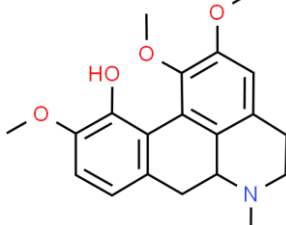
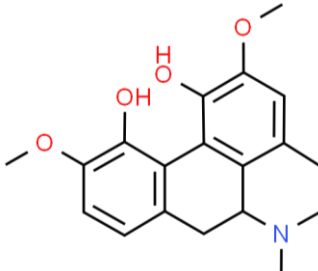
Os compostos selecionados são em sua maioria indólicos, cuja importância para a DA já foi apontada anteriormente, ou isoquirolínicos. Os alcalóides isoquinolínicos têm relatos de atuação na melhora dos danos nervosos causados por doenças neurodegenerativas. Além disso, estudos evidenciaram que além da atividade protetora, os alcalóides isoquinolínicos atuam na promoção do reparo e regeneração neuronal^{109,217}.

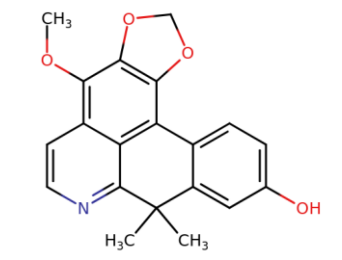
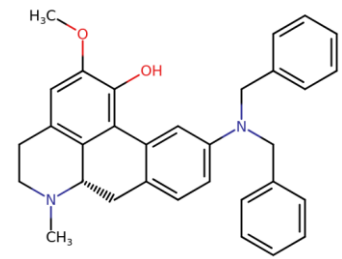
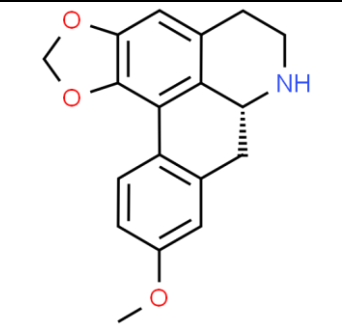
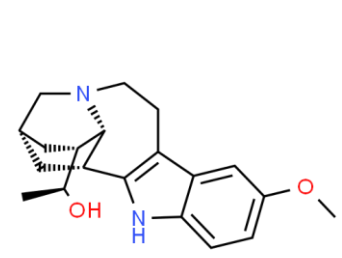
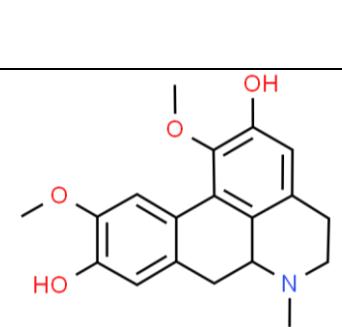
Outros alcalóides da mesma classe, como a beberina, possuem extensos relatos sobre a atividade no NACHR e sua atividade neuroprotetora, em geral. Um exemplo de sua importância é a galantamina, composto aprovado para o tratamento da DA, que atua tanto na enzima AChE como de forma alostérica no NACHR, sendo esta classe de grande valor para o tratamento da DA^{107,109,215}.

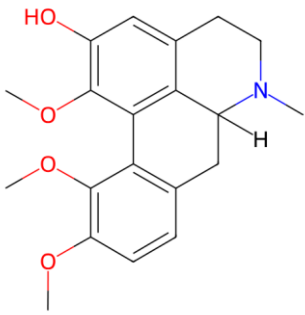
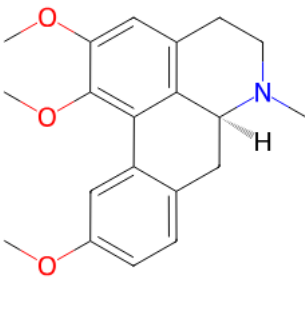
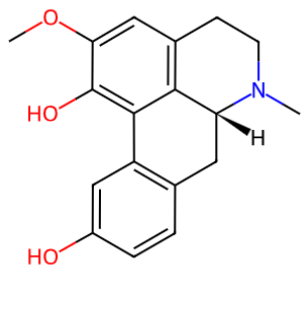
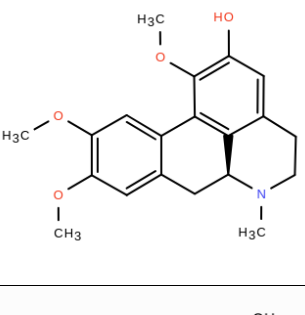
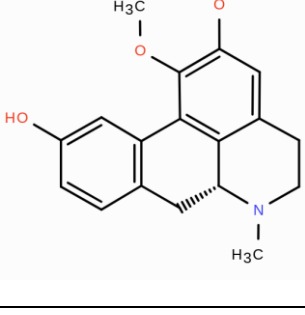
Compostos selecionados como de maior atividade segundo o modelo como a uleína, vallesiachotamina e nuciferina já possuem relatos na literatura frente à doença de Alzheimer, atuando não somente através do mecanismo de neuroproteção como também por meio da inibição da AChE. Substâncias como essas podem ser consideradas fortes candidatas para o tratamento desta doença devido a esse potencial de atuar em mais de um alvo, potencializando o resultado^{218,219}.

Por fim, foi realizada a definição do domínio de aplicabilidade usando o método de similaridade para o banco de alcalóides seguindo os parâmetros do modelo para a enzima AChE. Foram selecionadas 1246 estruturas, as quais foram submetidas ao modelo de predição de atividade, em valores de pIC50(nM) utilizando o modelo anteriormente elaborado. Os 15 compostos considerados como mais ativos pelo modelo estão representados na Tabela 13, em conjunto com os valores de atividade obtidos e suas estruturas químicas.

Tabela 13: Compostos classificados com maior probabilidade de atividade na enzima AChE, segundo o modelo elaborado.

COMPOSTO	CÓDIGO	ESTRUTURA	pIC50 (nM)
Norfoebina	CAS616		0,387
Ramiflorina B	CAS1296		0,377
Coridina	476-69-7		0,355
Isocoridina	475-67-2		0,349
Corituberina	71630-07-04		0,324

Guatterfriesidina	CAS970		0,307
(6aS)-10-(dibenzilamino)-2-metoxi-6-metil-5,6,6a,7-tetrahidro-4H-dibenzo[de,g]quinolin-1-ol	CAS833		0,307
Xilopina	CAS615		0,28
Iboxigaina	CAS1247		0,273
Boldina	55012-01-6		0,258

Litseglutina B	25368-01-8		0,21
1,2,10-trimethoxi-6-metil-5,6,6a,7-tetrahidro-4h-dibenzo[de,g]quinolina	28277-71-6		0,186
(-)-Apoglaziovina	2128-77-0		0,186
Predicentrina	20051-87-0		0,151
Nuciferolina	1862-49-3		0,148

Fonte: Elaboração Própria.

Os valores de atividade obtidos foram avaliados em comparação com valores de atividades observados experimentalmente para compostos com atividade conhecida na AChE. As substâncias donepezila, galantamina, rivastigmina são fármacos utilizados no tratamento da DA e os valores de atividade observados para esses compostos foram, respectivamente, -2,328, -3,713 e -4,452. Os valores observados para as estruturas químicas listados acima se apresentaram mais elevados do que os desses compostos, reafirmando a probabilidade desses compostos serem realmente ativos.

Novamente, os alcaloides selecionados são majoritariamente da classe dos isoquinolínicos e dos indólicos. Como dito anteriormente, existem evidências da atividade das substâncias dessa classe na atividade frente à DA, a exemplo da própria galantamina, também um alcaloide isoquinolínico que possui atividade inibitória da enzima^{109,220}.

Por fim, alguns dos compostos selecionados merecem certo destaque, como a isocoridina, xilopina e boldina. Esses três compostos possuem em comum o fato de já terem sido testados frente a AChE e outras enzimas associadas ao tratamento da DA. Diversos estudos os apontam como compostos de potencial atividade inibitória nessas enzimas, sendo somente a isocoridine classificada como um inibidor fraco²²¹⁻²²⁷.

O fato de o modelo elaborado conseguir identificar compostos com atividade já relatada no alvo reforça a sua capacidade preditiva, aumentando assim a probabilidade de que os outros compostos selecionados possuam real atividade na AChE também.

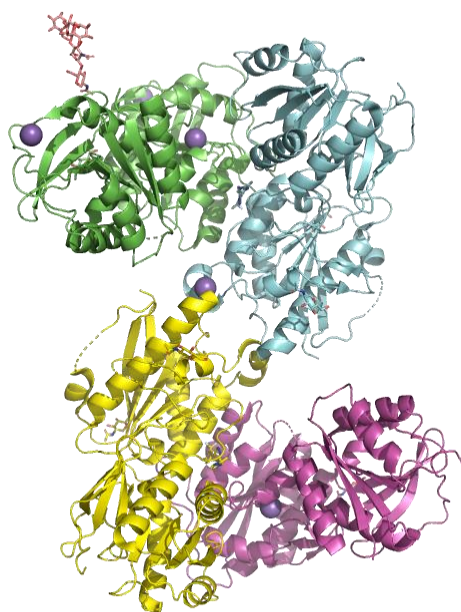
Para além dos resultados obtidos, é possível observar que de forma geral os alcaloides isoquinolínicos e indólicos foram os que apresentaram melhor desempenho nos modelos elaborados. Embora no espaço analisado não tenham sido identificados compostos que apresentem bom desempenho em mais de um alvo, essas classes podem ser consideradas um importante espaço químico para a investigação substâncias que atuem em diversos alvos frente à DA.

4.6. Docking Molecular

Assim como no QSAR para a elaboração do modelo de *docking*, foi elaborado um referencial teórico a fim de identificar as características importantes dos receptores e dos sítios ativos para a fisiopatologia da DA. Tendo definido os sítios de interesse, buscaram-se os aminoácidos de importância para o sítio e para a atividade no receptor, para assim ser possível interpretar os resultados obtidos pelo *docking*. Após definir esses pontos, foi realizada uma busca na plataforma PDB por estruturas que representassem os receptores.

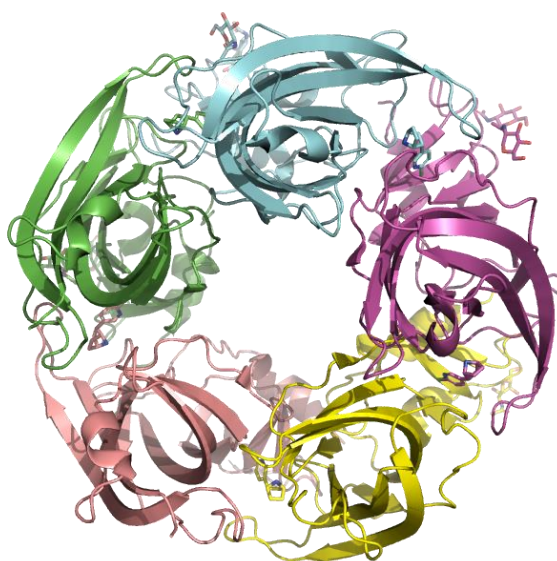
Para o receptor NMDA, foi realizada a busca por estruturas cristalográficas em específico contendo a subunidade GLUN2B, mais associada às áreas acometidas pela DA. A pesquisa resultou em 53 estruturas, seguindo o que foi anteriormente estabelecido, foi dada a preferência para aquelas estruturas complexadas com o ligante antagonista e que sejam representações do organismo *Homo sapiens*, resultando em 17 estruturas. Ao final da avaliação de qualidade e demais critérios necessários, foi selecionada a estrutura de código 5EWM para o receptor NMDA.

Figura 12: Estrutura Cristalográfica da proteína NMDA expressa pelo código 5EWM.



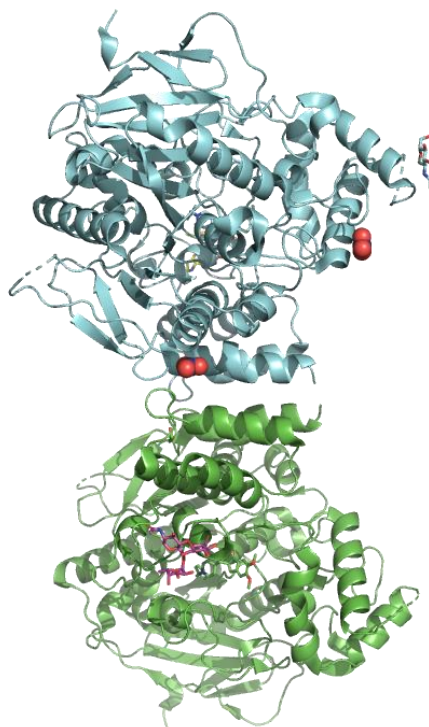
Para o receptor NACHR, a busca foi restrita a receptor do tipo $\alpha 7$ homopentamérico. Foram identificadas 34 estruturas, ao realizar o filtro para o organismo *Homo sapiens* não houve alterações quanto à quantidade. Ao realizar a busca por estruturas complexadas com substâncias de atividade agonista houve somente um retorno, a estrutura de código 3SQ6, sendo escolhida para a elaboração do modelo.

Figura 13: Estrutura cristalográfica da proteína NACHR expressa pelo código 3SQ6.



Para a AChE, a busca resultou em 305 estruturas depositadas no banco. Ao realizar os mesmos filtros já mencionados para os outros alvos, foram mantidas 75 estruturas para o organismo *Homo sapiens*, das quais 50 estavam complexadas com antagonistas. Sendo, por fim, selecionada a estrutura de código 4EY7.

Figura 14: Estrutura cristalográfica da proteína AChE expressa pelo código 4EY7.



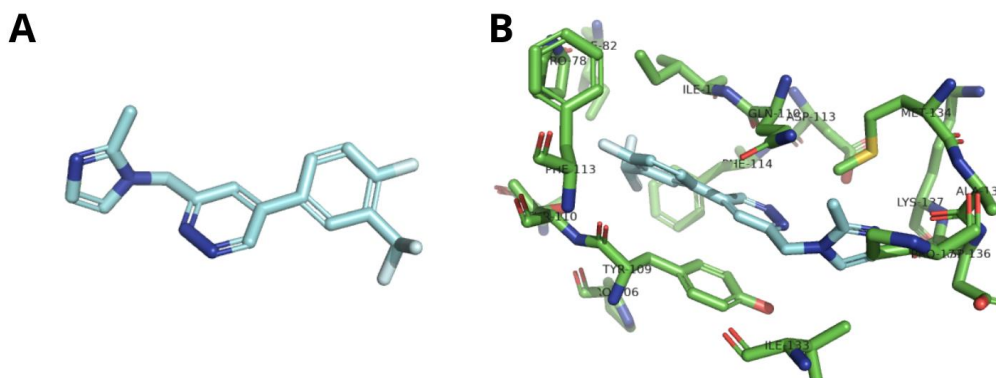
O preparo da estrutura ao *redocking* foi feito usando o GOLD, assim como os demais processos, até o *docking*. Primeiramente, é feita a adição de hidrogênio à estrutura, sendo seguida pela exclusão das águas presentes na mesma, isso é feito para que esses fatores não interfiram na afinidade do composto com o sítio ativo. Por fim, o último passo que compreende a preparação da estrutura, é a extração do ligante em questão, a partir deste que serão retiradas as coordenadas referentes ao sítio ativo.

Feito isso, começa o processo de *redocking* onde o ligante previamente extraído é então reinserido no seu sítio ativo. Para essa reinserção deve-se considerar a configuração feita para tal encaixe acontecer. Durante esse processo várias combinações de parâmetros são testadas, a fim de selecionar o modelo com a melhor capacidade de predição de atividade. Para isto as seguintes funções de pontuação foram utilizadas ChemPLP, ASP, GoldScore e ChemScore, combinados com os seguintes valores de raio: 6 Å, 8 Å, 10 Å, 12Å e 14 Å, em todas as estruturas selecionadas. Cada função de pontuação usa

parâmetros e características diferentes do complexo ligante-receptor, para pontuá-los.

Para o alvo NMDA, a configuração de melhor desempenho foi obtida com a função de pontuação ChemScore e o valor de raio de 14 Å, com média de RMSD igual a 1,73 como pode ser visualizado na Figura 15. A ChemScore é uma função de pontuação empírica parametrizada por meio de dados experimentais, considerando contato lipofílico-lipofílico, um termo de ligação de hidrogênio com restrição geométrica e um termo para penalizar a flexibilidade excessiva^{228–230}.

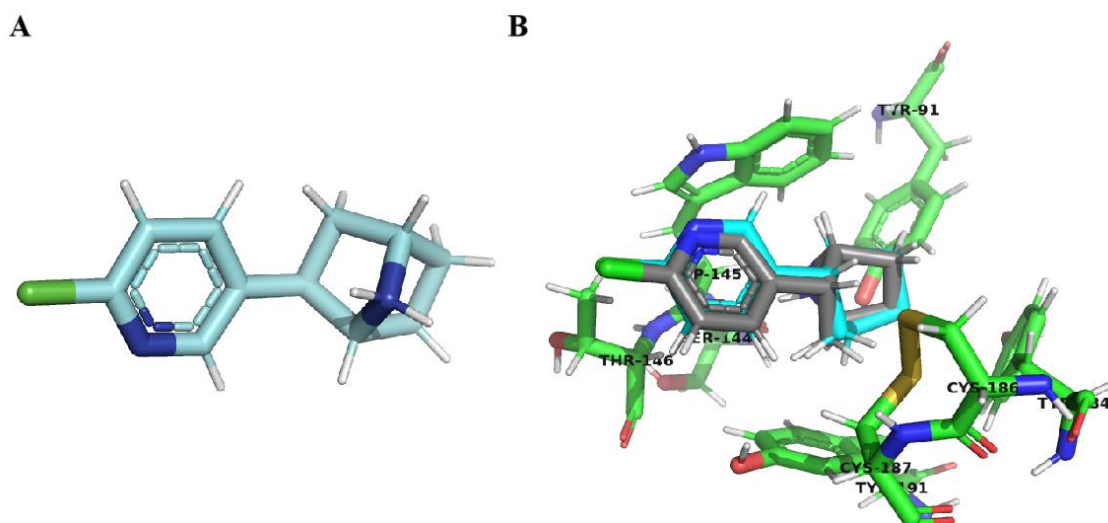
Figura 15: Em A temos a estrutura do EVT-101, ligante complexado com a estrutura 5EWM e em B temos a sobreposição do EVT-101, em azul, com o resultado do *redocking*, em cinza, e as interações feitas com os resíduos do sítio ativo.



Fonte: Elaboração Própria.

O conjunto de configurações de melhor desempenho para o modelo desenvolvido para o NACHR foi utilizando a função de pontuação ChemPLP no raio 6 Å com média de RMSD igual a 0,82, como pode ser visualizado na Figura 16. Esta também é uma função de pontuação empírica, mas incorpora princípios físicos das interações moleculares como forças de van der Waals, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e potenciais de repulsão^{228–230}.

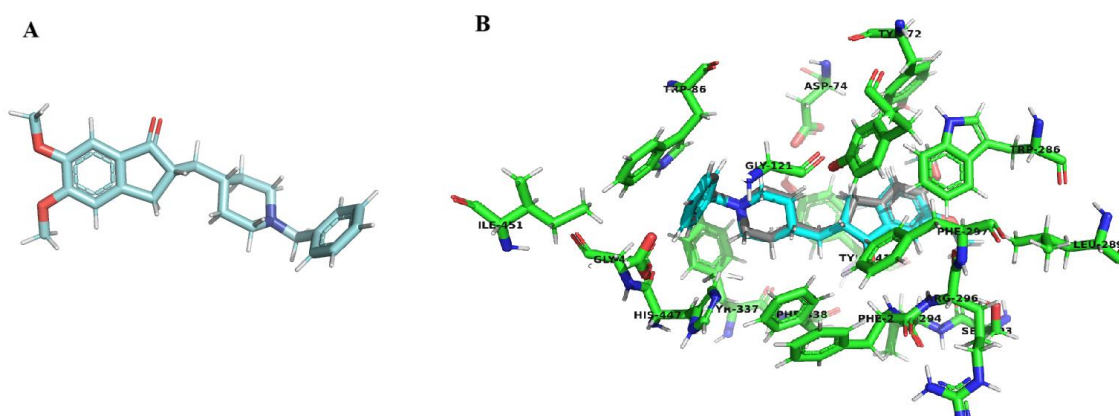
Figura 16: Em A temos a estrutura do epibatidine, ligante complexado com a estrutura 3QS6 e em B temos a sobreposição do epibatidine, em azul, com o resultado do *redocking*, em cinza, e as interações feitas com os resíduos do sítio ativo.



Fonte: Elaboração Própria.

Para o alvo AChE, os melhores resultados foram obtidos utilizando a função de pontuação ASP com um tamanho de raio de 10 Å com média de RMSD igual a 0,55, como pode ser visualizado na Figura 17. A função ASP utiliza uma abordagem estatística para estimar a afinidade do complexo ligante-receptor. A ASP gera potenciais estatísticos avaliando a frequência com que ocorrem interações específicas átomo a átomo em complexos existentes no PDB^{228,231}.

Figura 17: Em A temos a estrutura do donezepil, ligante complexado com a estrutura 4EY7 e em B temos a sobreposição do donezepil, em azul, com o resultado do *redocking*, em cinza, e as interações feitas com os resíduos do sítio ativo.



Fonte: Elaboração Própria.

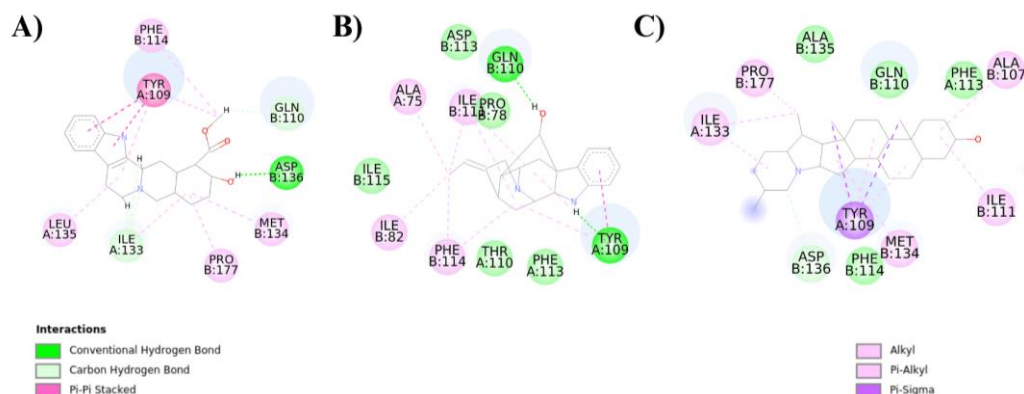
Os modelos de *docking* validados foram utilizados para a triagem virtual com as estruturas selecionados como promissoras para os respectivos bancos. Para avaliar o desempenho de cada uma das estruturas foi considerado a função de pontuação obtida no *redocking*. Foram selecionadas as três estruturas com valores de pontuação maior ou igual à média do valor obtido no *redocking*. Posterior à seleção, foram analisadas as interações realizadas com os aminoácidos importantes para a atividade.

Os compostos de melhor desempenho no *docking* para o receptor NMDA foram demissidina, nortetrafilicina, 3-epi- α -yohimbina, com pontuações de 31,86 30,98 e 30,62, respectivamente. A maior pontuação obtida no *redocking* foi de 30,75. As interações com os aminoácidos do sítio feita por essas estruturas podem ser visualizadas na Figura 18.

Quanto às interações realizadas, é possível notar que os ligantes apresentam interações favoráveis com os resíduos de aminoácidos do sítio. Os três ligantes apresentam interações favoráveis com os resíduos GLN110 e TYR109 de grande relevância para esse sítio. Com destaque para o ligante A que apresenta o mesmo tipo de ligação π observada no ligante EVT-101.

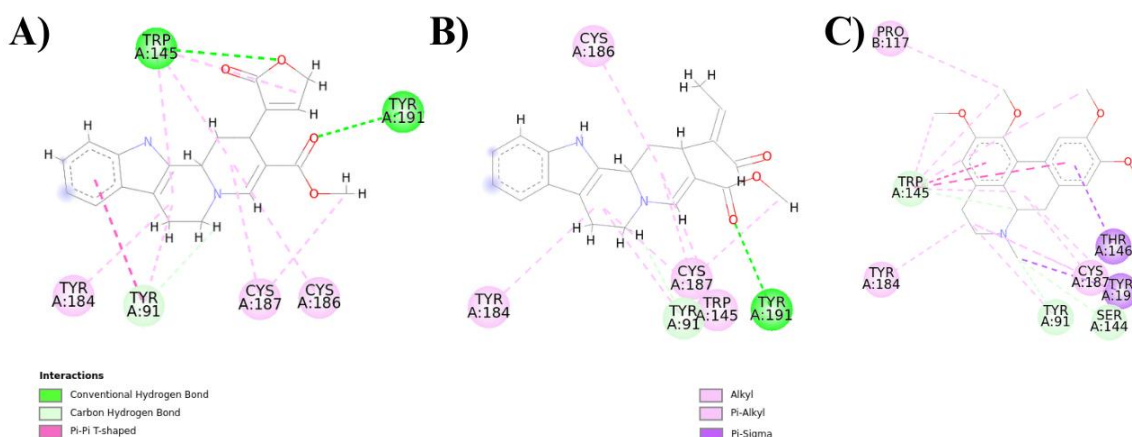
Outras interações como a vista na ILE133 e LEU176 também são apresentadas como relevantes para o encaixe neste sítio. Também é possível notar que os ligantes selecionados apresentam interações semelhantes às observadas no EVT-101, como as ligações de hidrogênio com o ASP136 e PRO78, do tipo alquil com o PRO177, PHE114 e MET134. Essas interações tão próximas com a de um ligante de atividade antagonista conhecida aumentam as chances desses compostos possuírem atividade *in vitro* ou *in vivo*⁶⁷.

Figura 18: Em A, B e C está representado, respectivamente, demissidina, nortetrafilicina, 3-epi- α -yohimbina e as interações realizadas entre eles e os aminoácidos presentes no sítio ativo da estrutura 5EWM.



Para o modelo elaborado para o receptor NACHR, os compostos de melhor desempenho na simulação de *docking*, conforme a pontuação obtida, foram: vallesiacotamina lactona, vallesiacotamina e glaucina. As pontuações desses compostos foram, respectivamente, 60,91, 56,86 e 54,68, sendo a maior pontuação obtida no *redocking* igual a 52,67. Novamente, as interações de cada substância com o sítio ativo foram analisadas e comparadas ao que está descrito na literatura e podem ser observadas na Figura 19.

Figura 19: Em A, B e C estão representados, respectivamente, as estruturas dos ligantes: vallesiacotamina lactona, vallesiacotamina, glaucina e as interações realizadas entre eles e os aminoácidos do sítio ativo da estrutura 3QS6.



Fonte: Elaboração Própria.

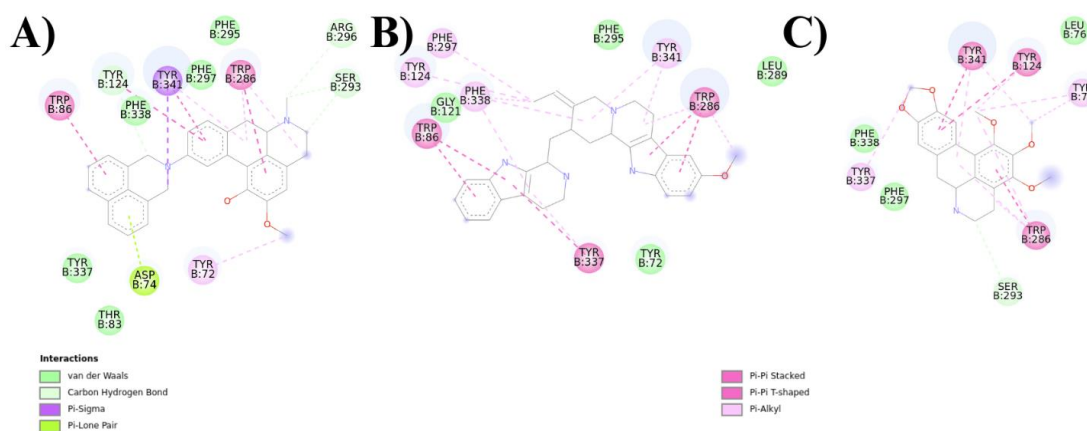
O sítio ativo do NACHR é composto de vários resíduos específicos e de grande importância para a função deste receptor. Os três ligantes selecionados apresentaram interações favoráveis com os resíduos TYR91, TRP145, TYR184

e TYR191, cuja importância para o reconhecimento do ligante e a transdução de sinal é amplamente discutido na literatura. Semelhante ao que acontece com a epibatine, também são observadas interações importantes com os resíduos CYS186 e CYS187, nos ligantes A e B.

Embora o ligante C não apresente a interação com o resíduo CYS186, ele apresenta algumas outras interações em comum com a epibatine não apresentadas pelos demais. É possível observar na imagem a presença de uma ligação do tipo Pi-Sigma entre o anel aromático da estrutura e o THR146, semelhante ao que ocorre no ligante originalmente complexado. Todas essas interações observadas contribuem como evidência de provável atividade dos compostos selecionados²³².

Por fim os compostos selecionados como promissores, segundo o modelo de *docking* desenvolvido para a enzima AChE foram: (6aS)-10-(dibenzilamino)-2-metoxi-6-metil-5,6,6a,7-tetra-hidro-4H-dibenzo[de,g]quinolin-1-ol, ramiflorina B e norfoebina. Os compostos selecionados apresentaram valores de função de pontuação de 65,82, 65,61 e 58,09 respectivamente, enquanto o maior valor de pontuação observado no *redocking* foi de 64,07. As interações de cada uma das estruturas com o sítio ativo podem ser visualizadas na Figura 20.

Figura 20: Em A, B e C estão representadas, respectivamente, as estruturas dos ligantes: (6aS)-10-(dibenzilamino)-2-metoxi-6-metil-5,6,6a,7-tetra-hidro-4H-dibenzo[de,g]quinolin-1-ol, ramiflorina B e norfoebina, e as interações realizadas entre eles e os aminoácidos do sítio ativo da estrutura 4EY7.



Fonte: Elaboração Própria.

Ao realizar as análises das interações apresentadas pelos ligantes selecionados, é possível observar que todos fazem interações significativas com os aminoácidos que compreendem a área do sítio aniônico e do PAS. Os três ligantes analisados apresentam interações com os resíduos TRP286 e TYR337, característicos do sítio aniônico. Além disso, também é observada interações do tipo π - π com o aminoácido TRP86, nos ligantes A e B, observada também na donepezila. Outras interações importantes com resíduos como TYR 72, PHE295, PHE297 e TYR341²³³.

Visto os resultados favoráveis observados nos modelos *in silico* dos compostos citados, estes podem ser considerados relevantes candidatos para as demais etapas de identificação de substâncias para o tratamento da doença de Alzheimer. Uma vez que além de possuírem as características químicas relevantes para a atividade nos respectivos alvos, fazem as interações necessárias com os aminoácidos dos sítios abordados.

5. CONCLUSÕES

O impacto da escassez de opções terapêuticas para o tratamento da doença de Alzheimer trouxe a tona a importância de desenvolver metodologias *in silico* capazes de acelerar o processo de identificação de compostos promissores. Desta forma, os modelos apresentados neste projeto se demonstraram boa capacidade preditiva para os receptores NMDA e NACHR, e para a enzima AChE, alvos de grande importância para doenças neurodegenerativas como a DA.

Os modelos de QSAR desenvolvidos mostraram-se válidos, precisos e robustos, com base nos diversos padrões estatísticos abordados. Os modelos reduziram o banco de 2.569 a 15 candidatos por alvo. Dentre essas estruturas selecionadas nota-se que todas apresentaram valores de atividade maiores ou próximos aos valores definidos experimentalmente para compostos ativos nos alvos em questão, reforçando a probabilidade de atividade dessas substâncias.

Os modelos de QSAR desenvolvidos foram também capazes de identificar compostos externos a sua elaboração que possuem atividade experimental relatada no receptor, como foi o caso da boldina na enzima

AChE. Ademais, grande parte das substâncias descobertas através da triagem apresenta atividade neuroprotetora documentada, enfatizando a relevância dessas substâncias como potenciais fármacos.

Também através da triagem foi possível avaliar e destacar as classes de alcaloides que possuem o melhor desempenho frente a esses alvos, podendo desta forma, reduzir o espaço de busca dentro dessa classe de produtos naturais, permitindo restringir as próximas buscas aos grupos de alcaloides isoquinolínicos e indólicos. Esse ponto de priorização, em conjunto com testes de abordagens de identificação de substâncias comuns a mais de um alvo, possibilita uma maior eficácia do tratamento.

Os modelos de *docking* elaborados também se mostraram válidos e precisos. Por meio deles, foi possível analisar com clareza as interações realizadas entre os alcaloides selecionados durante a triagem e os alvos abordados. Durante as análises de *docking* foi possível observar que os compostos selecionados como promissores apresentaram, além de bom desempenho no *docking*, interações favoráveis com os aminoácidos de importância relatada na literatura, reforçando a probabilidade de atividade.

Portanto, por meio das ferramentas de busca *in silico* abordadas nesse trabalho foi possível identificar substâncias que possuem um alto nível de evidência no que se refere a potencial atividade nos receptores considerados. A metodologia empregada permitiu reduzir um banco de quantidade substancial de estruturas, mantendo apenas os 9 compostos de maior probabilidade de atividade nos alvos, devendo estes serem considerados para estudos *in vitro* e *in vivo*.

Além de acelerar o processo de triagem, nosso método destacou os alcaloides isoquinolínicos e indólicos como classes promissoras, a serem consideradas em novas abordagens frente a DA. Os modelos desenvolvidos poderão auxiliar a classificar e direcionar futuras pesquisas para compostos com maior potencial terapêutico. Sendo assim, os modelos elaborados demonstraram significativa capacidade de acelerar a descoberta de novas opções terapêuticas para a doença de Alzheimer.

6. PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Para o futuro, as estruturas selecionadas como promissoras pelo *docking* deverão ser submetidas à modelos de dinâmica molecular, que permitirá uma maior compreensão sobre a estabilidade e comportamento desses ligantes nos sítios abordados no ambiente biológico abordado. Por meio dessas análises será possível consolidar as chances de atividades nos respectivos alvos e a eficácia dos modelos elaborados.

Novas triagens deverão ser realizadas com enfoque nos grupos de alcaloides sinalizados como promissores. Por meio dessa nova triagem será possível identificar substâncias promissoras que serão comuns a mais de um alvo, apresentando uma abordagem mais eficaz no tratamento da doença de Alzheimer. Outros bancos contendo compostos nitrogenados poderão ser utilizados para a triagem nos modelos desenvolvidos, aumentando assim a gama de compostos de provável atividade.

Além disso, os compostos promissores identificados através da dinâmica molecular poderão ser submetidos a testes *in vitro* e *in silico*. Esses testes fornecerão informações detalhadas sobre a eficácia e segurança dos compostos, permitindo a avaliação de suas potencialidades terapêuticas antes de avançar para estudos clínicos.

Em suma, futuras pesquisas poderão ser beneficiadas significativamente dos achados desse estudo. O estudo proporciona um avanço mais rápido e eficiente na descoberta de novos fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer, através da abordagem integrada e direcionada pela química computacional.

7. REFERÊNCIAS

- (1) Ju, Y.; Tam, K. Pathological Mechanisms and Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease. *Neural Regen. Res.* **2022**, *17* (3), 543. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320970>.
- (2) Kumar, A.; Sidhu, J.; Goyal, A.; Tsao, J. W. *Alzheimer Disease*; StatPearls Publishing, 2022.
- (3) Frandy-Marlen-Gamiz; Hannia-Rebeca-Morales; Yermerahí-Del Rocío-Nevarez; Brissia-Lazalde. Epigenetics in the Development of Alzheimer's Disease. *GSC Adv. Res. Rev.* **2024**, *19* (3), 156–163. <https://doi.org/10.30574/gscarr.2024.19.3.0208>.

- (4) Breijyeh, Z.; Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* **2020**, *25* (24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>.
- (5) Tariot, P. N. Alzheimer Disease: Current Challenges, Emerging Treatments: *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2003**, *17* (SUPPLEMENT 4), S98. <https://doi.org/10.1097/00002093-200307004-00003>.
- (6) Wimo, A.; Ballard, C.; Brayne, C.; Gauthier, S.; Handels, R.; Jones, R. W.; Jonsson, L.; Khachaturian, A. S.; Kramberger, M. Health Economic Evaluation of Treatments for Alzheimer's Disease: Impact of New Diagnostic Criteria. *J. Intern. Med.* **2014**, *275* (3), 304–316. <https://doi.org/10.1111/joim.12167>.
- (7) El-Hayek, Y. H.; Wiley, R. E.; Khoury, C. P.; Daya, R. P.; Ballard, C.; Evans, A. R.; Karran, M.; Molinuevo, J. L.; Norton, M.; Atri, A. Tip of the Iceberg: Assessing the Global Socioeconomic Costs of Alzheimer's Disease and Related Dementias and Strategic Implications for Stakeholders. *J. Alzheimers Dis.* **2019**, *70* (2), 323–341. <https://doi.org/10.3233/JAD-190426>.
- (8) K.M. Chaves, S.; M. Feitosa, C.; Da S. Araújo, L. Alkaloids Pharmacological Activities - Prospects for the Development of Phytopharmaceuticals for Neurodegenerative Diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17* (7), 629–635. <https://doi.org/10.2174/138920101707160503201541>.
- (9) Andrade, S.; Ramalho, M. J.; Loureiro, J. A.; Pereira, M. D. C. Natural Compounds for Alzheimer's Disease Therapy: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (9), 2313. <https://doi.org/10.3390/ijms20092313>.
- (10) Scotti, L.; Scotti, M. T. In Silico Studies Applied to Natural Products with Potential Activity Against Alzheimer's Disease. In *Computational Modeling of Drugs Against Alzheimer's Disease*; Roy, K., Ed.; Neuromethods; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 132, pp 513–531. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7404-7_18.
- (11) Onifade, I. A.; Umar, H. I.; Aborode, A. T.; Awaji, A. A.; Jegede, I. D.; Adeleye, B. H.; Fatoba, D. O. In Silico Study of Selected Alkaloids as Dual Inhibitors of β and γ -Secretases for Alzheimer's Disease. September 14, 2024. <https://doi.org/10.1101/2024.09.10.612359>.
- (12) Batool, S.; Hasan Mahmood, M. S.; Furqan, T.; Karim, M.; Batool, S. In Silico Analysis of Alkaloids for Therapeutic Use in Treatment of Alzheimer's Disease by Targeting Acetylcholinesterase Enzyme. *Neurol. Neurobiol.* **2021**, 1–6. <https://doi.org/10.31487/j.NNB.2021.02.02>.
- (13) WHO. *Dementia*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (accessed 2023-12-15).
- (14) Lane, C. A.; Hardy, J.; Schott, J. M. Alzheimer's Disease. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25* (1), 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>.
- (15) Alzheimer's Association. 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement.* **2020**, *16* (3), 391–460. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>.
- (16) Deb, A.; Thornton, J. D.; Sambamoorthi, U.; Innes, K. Direct and Indirect Cost of Managing Alzheimer's Disease and Related Dementias in the

- United States. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* **2017**, 17 (2), 189. <https://doi.org/10.1080/14737167.2017.1313118>.
- (17) Wong, W. Economic Burden of Alzheimer Disease and Managed Care Considerations. *Am. J. Manag. Care* **2020**, 26 (Suppl 8), S177–S183. <https://doi.org/10.37765/ajmc.2020.88482>.
 - (18) Zahra, W.; Rai, S. N.; Birla, H.; Singh, S. S.; Dilnashin, H.; Rathore, A. S.; Singh, S. P. The Global Economic Impact of Neurodegenerative Diseases: Opportunities and Challenges. In *Bioeconomy for Sustainable Development*; Keswani, C., Ed.; Springer Singapore: Singapore, 2020; pp 333–345. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9431-7_17.
 - (19) Abbott, A. Conquering Alzheimer's: A Look at the Therapies of the Future. *Nature* **2023**, 616 (7955), 26–28. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-00954-w>.
 - (20) Alam, S.; Lingenfelter, K. S.; Bender, A. M.; Lindsley, C. W. Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, 8 (9), 1823–1829. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00270>.
 - (21) Bloemer, J. Drugs Used in the Treatment of Alzheimer's Disease. In *Side Effects of Drugs Annual*; Elsevier B.V., 2020; Vol. 42, pp 55–65. <https://doi.org/10.1016/bs.seda.2020.09.003>.
 - (22) Hoskin, J. L.; Al-Hasan, Y.; Sabbagh, M. N. Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists for the Treatment of Alzheimer's Dementia: An Update. *Nicotine Tob. Res.* **2019**, 21 (3), 370–376. <https://doi.org/10.1093/ntr/nty116>.
 - (23) Cheng, Y.-J.; Lin, C.-H.; Lane, H.-Y. Involvement of Cholinergic, Adrenergic, and Glutamatergic Network Modulation with Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22 (5), 2283. <https://doi.org/10.3390/ijms22052283>.
 - (24) Conway, M. E. Alzheimer's Disease: Targeting the Glutamatergic System. *Biogerontology* **2020**, 21 (3), 257–274. <https://doi.org/10.1007/s10522-020-09860-4>.
 - (25) Gasiorowska, A.; Wydrych, M.; Drapich, P.; Zadrozny, M.; Steczkowska, M.; Niewiadomski, W.; Niewiadomska, G. The Biology and Pathobiology of Glutamatergic, Cholinergic, and Dopaminergic Signaling in the Aging Brain. *Front. Aging Neurosci.* **2021**, 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.654931>.
 - (26) Danysz, W.; Parsons, C. G. Alzheimer's Disease, B-amyloid, Glutamate, NMDA Receptors and Memantine – Searching for the Connections. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, 167 (2), 324–352. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02057.x>.
 - (27) Soria Lopez, J. A.; González, H. M.; Léger, G. C. Alzheimer's Disease. *Handb. Clin. Neurol.* **2019**, 167, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>.
 - (28) Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. *The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Review of Progress*; 1999; Vol. 66, pp 137–147.
 - (29) Hampel, H.; Mesulam, M.-M.; Cuello, A. C.; Farlow, M. R.; Giacobini, E.; Grossberg, G. T.; Khachaturian, A. S.; Vergallo, A.; Cavedo, E.; Snyder, P. J.; Khachaturian, Z. S. The Cholinergic System in the Pathophysiology

- and Treatment of Alzheimer's Disease. *Brain* **2018**, *141* (7), 1917–1933. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>.
- (30) Hampel, H.; Mesulam, M.-M.; Cuello, A. C.; Khachaturian, A. S.; Vergallo, A.; Farlow, M. R.; Snyder, P. J.; Giacobini, E.; Khachaturian, Z. S. Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *J. Prev. Alzheimers Dis.* **2019**, *6* (1), 2–15. <https://doi.org/10.14283/jpad.2018.43>.
 - (31) Cuello, A. C.; Granholm, L.; Chen, X.-Q.; Mobley, W. C. Exploring the Pathogenesis of Alzheimer Disease in Basal Forebrain Cholinergic Neurons: Converging Insights From Alternative Hypotheses. **2016**. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00446>.
 - (32) dos Santos Picanco, L. C.; Ozela, P. F.; de Fatima de Brito Brito, M.; Pinheiro, A. A.; Padilha, E. C.; Braga, F. S.; de Paula da Silva, C. H. T.; dos Santos, C. B. R.; Rosa, J. M. C.; da Silva Hage-Melim, L. I. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25* (26), 3141–3159. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161213101126>.
 - (33) Athar, T.; Al Balushi, K.; Shah, A.; Khan, A. Recent Advances on Drug Development and Emerging Therapeutic Agents for Alzheimer's Disease. **2021**, *48*, 5629–5645. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06512-9>.
 - (34) García-Ayllón, M.-S. Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-Tau and β -Amyloid. *Front. Mol. Neurosci.* **2011**, *4*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00022>.
 - (35) Sharma, K. Cholinesterase Inhibitors as Alzheimer's Therapeutics (Review). *Mol. Med. Rep.* **2019**. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>.
 - (36) Patocka, J.; Kuca, K.; Jun, D. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase--Important Enzymes of Human Body. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **2004**, *47* (4), 215–228.
 - (37) Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: "classical" and "Non-Classical" Functions and Pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5* (3), 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.01.014>.
 - (38) Walczak-Nowicka, Ł. J.; Herbet, M. Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Diseases and the Role of Acetylcholinesterase in Their Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (17), 9290. <https://doi.org/10.3390/ijms22179290>.
 - (39) Giacobini, E. *Cholinesterases: New Roles in Brain Function and in Alzheimer's Disease**; 2003; Vol. 28, pp 515–522. <https://doi.org/10.1023/A:1022869222652>.
 - (40) Bourne, Y.; Radić, Z.; Sulzenbacher, G.; Kim, E.; Taylor, P.; Marchot, P. Substrate and Product Trafficking through the Active Center Gorge of Acetylcholinesterase Analyzed by Crystallography and Equilibrium Binding. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (39), 29256–29267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603018200>.
 - (41) Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *187* (1–3), 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>.

- (42) Macdonald, I. R.; Martin, E.; Rosenberry, T. L.; Darvesh, S. Probing the Peripheral Site of Human Butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **2012**, 51 (36), 7046–7053. <https://doi.org/10.1021/bi300955k>.
- (43) Rosenberry, T.; Brazzolotto, X.; Macdonald, I.; Wandhammer, M.; Trovaslet-Leroy, M.; Darvesh, S.; Nachon, F. Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. *Molecules* **2017**, 22 (12), 2098. <https://doi.org/10.3390/molecules22122098>.
- (44) Ferreira-Vieira, T. H.; Guimaraes, I. M.; Silva, F. R.; Ribeiro, F. M. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* **2016**, 14 (1), 101–115.
- (45) McGehee, D. S.; Heath, M. J. S.; Gelber, S.; Devay, P.; Role, L. W. Nicotine Enhancement of Fast Excitatory Synaptic Transmission in CNS by Presynaptic Receptors. *Science* **1995**, 269 (5231), 1692–1696. <https://doi.org/10.1126/science.7569895>.
- (46) Zappettini, S.; Grilli, M.; Salamone, A.; Fedele, E.; Marchi, M.; Marchi, M.; Di, S. Pre-Synaptic Nicotinic Receptors Evoke Endogenous Glutamate and Aspartate Release from Hippocampal Synaptosomes by Way of Distinct Coupling Mechanisms Correspondence. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 161, 1161. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00958.x>.
- (47) Zhong, C.; Talmage, D. A.; Role, L. W. Nicotine Elicits Prolonged Calcium Signaling along Ventral Hippocampal Axons. *PLoS ONE* **2013**, 8 (12), e82719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082719>.
- (48) Giastas, P.; Zouridakis, M.; Tzartos, S. J. Understanding Structure–Function Relationships of the Human Neuronal Acetylcholine Receptor: Insights from the First Crystal Structures of Neuronal Subunits. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, 175 (11), 1880–1891. <https://doi.org/10.1111/bph.13838>.
- (49) Ventura, A. L. M.; Abreu, P. A.; Freitas, R. C. C.; Sathler, P. C.; Loureiro, N.; Castro, H. C. Sistema Colinérgico: Revisitando Receptores, Regulação e a Relação Com a Doença de Alzheimer, Esquizofrenia, Epilepsia e Tabagismo. *Rev. Psiquiatr. Clínica* **2009**, 37 (21), 74–80.
- (50) Craig, L. A.; Hong, N. S.; McDonald, R. J. Revisiting the Cholinergic Hypothesis in the Development of Alzheimer's Disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2011**, 35 (6), 1397–1409. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.03.001>.
- (51) Echeverria, V.; Mendoza, C.; Iarkov, A. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Learning and Memory Deficits in Neuroinflammatory Diseases. *Front. Neurosci.* **2023**, 17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1179611>.
- (52) Stone, T. W. Relationships and Interactions between Ionotropic Glutamate Receptors and Nicotinic Receptors in the CNS. *Neuroscience* **2021**, 468, 321–365. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.06.007>.
- (53) Lombardo, S.; Maskos, U. Role of the Nicotinic Acetylcholine Receptor in Alzheimer's Disease Pathology and Treatment. *Neuropharmacology* **2015**, 96 (PB), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.018>.
- (54) Wang, H.-Y.; Stucky, A.; Liu, J.; Shen, C.; Trocme-Thibierge, C.; Morain, P. Dissociating Beta-Amyloid from Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine

- Receptor by a Novel Therapeutic Agent, S 24795, Normalizes Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine and NMDA Receptor Function in Alzheimer's Disease Brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2009**, 29 (35), 10961–10973. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6088-08.2009>.
- (55) Butterfield, D. A.; Pocernich, C. B. The Glutamatergic System and Alzheimer's Disease. *CNS Drugs* **2003**, 17 (9), 641–652. <https://doi.org/10.2165/00023210-200317090-00004>.
- (56) Gonda, X. Basic Pharmacology of NMDA Receptors. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, 18 (12), 1558–1567. <https://doi.org/10.2174/138161212799958521>.
- (57) Furukawa, H.; Singh, S. K.; Mancusso, R.; Gouaux, E. Subunit Arrangement and Function in NMDA Receptors. **2005**, 438 (November), 185–192. <https://doi.org/10.1038/nature04089>.
- (58) Babaei, P. NMDA and AMPA Receptors Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, 908 (174310), 174310. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174310>.
- (59) Liu, W.; Jiang, X.; Zu, Y.; Yang, Y.; Liu, Y.; Sun, X.; Xu, Z.; Ding, H.; Zhao, Q. A Comprehensive Description of GluN2B-Selective N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 200, 112447. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112447>.
- (60) Paoletti, P. Molecular Basis of NMDA Receptor Functional Diversity. *Eur. J. Neurosci.* **2011**, 33 (8), 1351–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x>.
- (61) Petrenko, A. B.; Yamakura, T.; Baba, H.; Shimoji, K. The Role of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. *Anesth. Analg.* **2003**, 97 (4), 1108–1116. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000081061.12235.55>.
- (62) Baez, M. V.; Cercato, M. C.; Jerusalinsky, D. A. NMDA Receptor Subunits Change after Synaptic Plasticity Induction and Learning and Memory Acquisition. *Neural Plast.* **2018**, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/5093048>.
- (63) Liu, J.; Chang, L.; Song, Y.; Li, H.; Wu, Y. The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* **2019**, 13, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00043>.
- (64) Blanke, M. L.; VanDongen, A. M. J. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In *Biology of the NMDA receptors*; VanDongen, A. M., Ed.; Boca Raton (FL): CRC Press / Taylor & Francis, 2009.
- (65) Cummings, K. A.; Popescu, G. K. Glycine-Dependent Activation of NMDA Receptors. *J. Gen. Physiol.* **2015**, 145 (6), 513–527. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411302>.
- (66) Schreiber, J. A.; Schepmann, D.; Frehland, B.; Thum, S.; Datunashvili, M.; Budde, T.; Hollmann, M.; Strutz-Seebohm, N.; Wünsch, B.; Seebohm, G. A Common Mechanism Allows Selective Targeting of GluN2B Subunit-Containing N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Commun. Biol.* **2019**, 2 (1), 420. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0645-6>.
- (67) Stroebel, D.; Buhl, D. L.; Knafels, J. D.; Chanda, P. K.; Green, M.; Sciabola, S.; Mony, L.; Paoletti, P.; Pandit, J. A Novel Binding Mode Reveals Two Distinct Classes of NMDA Receptor GluN2B-Selective Antagonists. *Mol. Pharmacol.* **2016**, 89 (5), 541–551. <https://doi.org/10.1124/mol.115.103036>.

- (68) Matthews, D. C.; Mao, X.; Dowd, K.; Tsakanikas, D.; Jiang, C. S.; Meuser, C.; Andrews, R. D.; Lukic, A. S.; Lee, J.; Hampilos, N.; Shafii, N.; Sano, M.; David Mozley, P.; Fillit, H.; McEwen, B. S.; Shungu, D. C.; Pereira, A. C. Riluzole, a Glutamate Modulator, Slows Cerebral Glucose Metabolism Decline in Patients with Alzheimer's Disease. *Brain J. Neurol.* **2021**, *144* (12), 3742–3755. <https://doi.org/10.1093/brain/awab222>.
- (69) Yiannopoulou, K. G.; Papageorgiou, S. G. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* **2020**, *12*, 117957352090739. <https://doi.org/10.1177/1179573520907397>.
- (70) Baskin, I. Fragment Descriptors in SAR/QSAR/QSPR Studies, Molecular Similarity Analysis and in Virtual Screening. In *Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening*; Varnek, A., Ed.; The Royal Society of Chemistry, 2008; pp 1–43. <https://doi.org/10.1039/9781847558879-00001>.
- (71) Leelananda, S. P.; Lindert, S. Computational Methods in Drug Discovery. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12* (1), 2694–2718. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.267>.
- (72) Medina-Franco, J. L.; Sánchez-Cruz, N.; López-López, E.; Díaz-Eufracio, B. I. Progress on Open Chemoinformatic Tools for Expanding and Exploring the Chemical Space. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2022**, *36* (5), 341–354. <https://doi.org/10.1007/s10822-021-00399-1>.
- (73) Ferreira, L.; dos Santos, R.; Oliva, G.; Andricopulo, A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* **2015**, *20* (7), 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- (74) Galati, S.; Di Stefano, M.; Martinelli, E.; Poli, G.; Tuccinardi, T. Recent Advances in In Silico Target Fishing. *Mol. Basel Switz.* **2021**, *26* (17), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules26175124>.
- (75) Bastikar, V.; Bastikar, A.; Gupta, P. Quantitative Structure–Activity Relationship-Based Computational Approaches. In *Computational Approaches for Novel Therapeutic and Diagnostic Designing to Mitigate SARS-CoV-2 Infection*; Elsevier, 2022; Vol. 21, pp 191–205. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91172-6.00001-7>.
- (76) Lim, S. V.; Rahman, M. B. A.; Tejo, B. A. Structure-Based and Ligand-Based Virtual Screening of Novel Methyltransferase Inhibitors of the Dengue Virus. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12* (S13), S24. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S13-S24>.
- (77) Danishuddin; Khan, A. U. Descriptors and Their Selection Methods in QSAR Analysis: Paradigm for Drug Design. *Drug Discov. Today* **2016**, *21* (8), 1291–1302. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.013>.
- (78) Lin, X.; Li, X.; Lin, X. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. *Molecules* **2020**, *25* (6), 1375. <https://doi.org/10.3390/molecules25061375>.
- (79) Verma, J.; Khedkar, V. M.; Coutinho, E. C. 3D-QSAR in Drug Design--a Review. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (1), 95–115. <https://doi.org/10.2174/156802610790232260>.
- (80) González-Arjona, D.; López-Pérez, G.; Gustavo González, A. Non-Linear QSAR Modeling by Using Multilayer Perceptron Feedforward Neural Networks Trained by Back-Propagation. *Talanta* **2002**, *56* (1), 79–90.

- (81) Pirhadi, S.; Shiri, F.; Ghasemi, J. B. Multivariate Statistical Analysis Methods in QSAR. *RSC Adv.* **2015**, 5 (127), 104635–104665. <https://doi.org/10.1039/C5RA10729F>.
- (82) Tandon, H.; Chakraborty, T.; Suhag, V. A Concise Review on the Significance of QSAR in Drug Design. *Chem. Biomol. Eng.* **2019**, 4 (4), 45. <https://doi.org/10.11648/j.cbe.20190404.11>.
- (83) Golbraikh, A.; Shen, M.; Xiao, Z.; Xiao, Y.-D.; Lee, K.-H.; Tropsha, A. Rational Selection of Training and Test Sets for the Development of Validated QSAR Models. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2003**, 17 (2–4), 241–253. <https://doi.org/10.1023/a:1025386326946>.
- (84) Martin, T. M.; Harten, P.; Young, D. M.; Muratov, E. N.; Golbraikh, A.; Zhu, H.; Tropsha, A. Does Rational Selection of Training and Test Sets Improve the Outcome of QSAR Modeling? *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52 (1), 2570–2578.
- (85) Martínez, M. J.; Ponzoni, I.; Díaz, M. F.; Vazquez, G. E.; Soto, A. J. Visual Analytics in Cheminformatics: User-Supervised Descriptor Selection for QSAR Methods. *J. Cheminformatics* **2015**, 7 (1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13321-015-0092-4>.
- (86) Naqvi, A. A. T.; Mohammad, T.; Hasan, G. M.; Hassan, Md. I. Advancements in Docking and Molecular Dynamics Simulations Towards Ligand-Receptor Interactions and Structure-Function Relationships. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, 18 (20), 1755–1768. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181025114157>.
- (87) Becerra, G. P.; Rojas-Rodríguez, F.; Ramírez, D.; Loaiza, A. E.; Tobar-Tosse, F.; Mejía, S. M.; González, J. Structural and Functional Computational Analysis of Nicotine Analogs as Potential Neuroprotective Compounds in Parkinson Disease. *Comput. Biol. Chem.* **2020**, 86, 107266. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107266>.
- (88) Chaudhary, K. K.; Mishra, N. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem* **2016**, 4 (3), 1029. <https://doi.org/10.47739/2334-1831/1029>.
- (89) Rodrigues, R. P.; Mantoani, S. P.; Almeida, J. R. de; Pinsetta, F. R.; Semighini, E. P.; Silva, V. B. da; Silva, C. H. T. P. da. Virtual Screening Strategies in Drug Design. *Rev. Virtual Quím.* **2012**, 4 (6), 739–776. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120055>.
- (90) Al-Khodairy, F. M.; Kalim, M.; Khan, A.; Kunhi, M.; Pulicat, M. S.; Akhtar, S.; Arif, J. M. In Silico Prediction of Mechanism of Erythrin-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines. *Am. J. Bioinforma. Res.* **2013**, 2013 (3), 62–71. <https://doi.org/10.5923/j.bioinformatics.20130303.03>.
- (91) Mateev, E.; Valkova, I.; Angelov, B.; Georgieva, M.; Zlatkov, A. VALIDATION THROUGH RE-DOCKING, CROSS-DOCKING AND LIGAND ENRICHMENT IN VARIOUS WELL-RESOLUTED MAO-B RECEPTORS. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2022**, 13 (3), 1000–1007. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13\(3\).1099-07](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.13(3).1099-07).
- (92) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30 (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.

- (93) Agrawal, P.; Singh, H.; Srivastava, H. K.; Singh, S.; Kishore, G.; Raghava, G. P. S. Benchmarking of Different Molecular Docking Methods for Protein-Peptide Docking. *BMC Bioinformatics* **2019**, *19* (Suppl 13), 426. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2449-y>.
- (94) Bueno, P. S. A.; Kato-Schwartz, C. G.; de Souza Lima, D.; Bracht, A.; Peralta, R. M.; Seixas, F. A. V. In Silico Evaluation of Condensed and Hydrolysable Tannins as Inhibitors of Pancreatic α -Amylase. *J. Mol. Model.* **2019**, *25* (9), 275. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4176-3>.
- (95) SIREESHA, B.; REDDY, B. V.; BASHA, S. K.; CHANDRA, K.; ANASUYA, D. A REVIEW ON PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF ALKALOIDS. *World J. Curr. Med. Pharm. Res.* **2019**, *01* (06), 230–234. <https://doi.org/10.37022/WJCMR.2019.01068>.
- (96) Xu, Z.; Ullah, N.; Duan, Y.; Hou, Z.; Liu, A.; Xu, L. Editorial: Plant Secondary Metabolites and Their Effects on Environmental Adaptation Based on Functional Genomics. *Front. Genet.* **2023**, *14*, 1211639. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1211639>.
- (97) Ferreira, M.-J. U. Alkaloids in Future Drug Discovery. *Mol. Basel Switz.* **2022**, *27* (4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041347>.
- (98) Matsuura, H. N.; Fett-Neto, A. G. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. In *Plant Toxins*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2015; pp 1–15. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_2-1.
- (99) Dey, P.; Kundu, A.; Kumar, A.; Gupta, M.; Lee, B. M.; Bhakta, T.; Dash, S.; Kim, H. S. Analysis of Alkaloids (Indole Alkaloids, Isoquinoline Alkaloids, Tropane Alkaloids). In *Recent Advances in Natural Products Analysis*; Elsevier, 2020; pp 505–567. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9>.
- (100) Leclerc, A.; Fournier, P. The Role of Alkaloids in Natural Products Chemistry. *Int. J. Herb. Med.* **2024**, *12* (5), 07–10. <https://doi.org/10.22271/flora.2024.v12.i5a.945>.
- (101) Hussain, G.; Rasul, A.; Anwar, H.; Aziz, N.; Razzaq, A.; Wei, W.; Ali, M.; Li, J.; Li, X. Role of Plant Derived Alkaloids and Their Mechanism in Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Biol. Sci.* **2018**, *14* (3), 341–357. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23247>.
- (102) Kong, Y. R.; Tay, K. C.; Su, Y. X.; Wong, C. K.; Tan, W. N.; Khaw, K. Y. Potential of Naturally Derived Alkaloids as Multi-Targeted Therapeutic Agents for Neurodegenerative Diseases. *Mol. Basel Switz.* **2021**, *26* (3). <https://doi.org/10.3390/molecules26030728>.
- (103) Kafarski, P.; Lipok, M. Structural Analogy — Direct Similarity Versus Topographical Complementarity. In *Drug Discovery and Development - From Molecules to Medicine*; InTech, 2015. <https://doi.org/10.5772/59401>.
- (104) Romero-Durán, F. J.; Alonso, N.; Yañez, M.; Caamaño, O.; García-Mera, X.; González-Díaz, H. Brain-Inspired Cheminformatics of Drug-Target Brain Interactome, Synthesis, and Assay of TVP1022 Derivatives. *Neuropharmacology* **2016**, *103*, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.019>.
- (105) Gordon, R. K.; Nigam, S. V.; Weitz, J. A.; Dave, J. R.; Doctor, B. P.; Ved, H. S. The NMDA Receptor Ion Channel: A Site for Binding of Huperzine

- A. J. *Appl. Toxicol. JAT* **2001**, 21 Suppl 1, S47-51. <https://doi.org/10.1002/jat.805>.
- (106) Liang, W.; Lam, W.; Tang, H.; Leung, P.; Yew, D. Current Evidence of Chinese Herbal Constituents with Effects on NMDA Receptor Blockade. *Pharmaceuticals* **2013**, 6 (8), 1039–1054. <https://doi.org/10.3390/ph6081039>.
- (107) Lima, J. A.; Hamerski, L. Alkaloids as Potential Multi-Target Drugs to Treat Alzheimer's Disease. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier B.V., 2019; Vol. 61, pp 301–334. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64183-0.00008-7>.
- (108) Nigdelioglu Dolanbay, S.; Kocanci, F. G.; Aslim, B. Neuroprotective Effects of Allocryptopine-Rich Alkaloid Extracts against Oxidative Stress-Induced Neuronal Damage. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, 140, 111690. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111690>.
- (109) Li, J.; Wu, Y.; Dong, S.; Yu, Y.; Wu, Y.; Xiang, B.; Li, Q. Research Progress on Neuroprotective Effects of Isoquinoline Alkaloids. *Molecules* **2023**, 28 (12), 4797. <https://doi.org/10.3390/molecules28124797>.
- (110) Sirin, S.; Nigdelioglu Dolanbay, S.; Aslim, B. Role of Plant Derived Alkaloids as Antioxidant Agents for Neurodegenerative Diseases. *Health Sci. Rev.* **2023**, 6, 100071. <https://doi.org/10.1016/j.hsr.2022.100071>.
- (111) Cortes, N.; Posada-Duque, R.; Cardona-Gómez, G. P.; Bastida, J.; Osorio, E. Amaryllidaceae Alkaloids and Neuronal Cell Protection. In *Pathology*; Elsevier, 2020; pp 135–144. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815972-9.00013-5>.
- (112) Morales, I.; Guzmán-Martínez, L.; Cerda-Troncoso, C.; Farfás, G. A.; Maccioni, R. B. Neuroinflammation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. A Rational Framework for the Search of Novel Therapeutic Approaches. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00112>.
- (113) Aryal, B.; Raut, B. K.; Bhattarai, S.; Bhandari, S.; Tandan, P.; Gyawali, K.; Sharma, K.; Ranabhat, D.; Thapa, R.; Aryal, D.; Ojha, A.; Devkota, H. P.; Parajuli, N. Potential Therapeutic Applications of Plant-Derived Alkaloids against Inflammatory and Neurodegenerative Diseases. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2022**, 2022, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2022/7299778>.
- (114) Ng, Y. P.; Or, T. C. T.; Ip, N. Y. Plant Alkaloids as Drug Leads for Alzheimer's Disease. *Neurochem. Int.* **2015**, 89, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.018>.
- (115) Jorgensen, W. L. The Many Roles of Computation in Drug Discovery. *Science* **2004**, 303 (5665), 1813–1818. <https://doi.org/10.1126/science.1096361>.
- (116) Neves, B. J.; Braga, R. C.; Melo-Filho, C. C.; Moreira-Filho, J. T.; Muratov, E. N.; Andrade, C. H. QSAR-Based Virtual Screening: Advances and Applications in Drug Discovery. *Front. Pharmacol.* **2018**, 9 (1), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01275>.
- (117) Zhu, H.; Zhang, Y.; Li, W.; Huang, N. A Comprehensive Survey of Prospective Structure-Based Virtual Screening for Early Drug Discovery in the Past Fifteen Years. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23 (24), 15961. <https://doi.org/10.3390/ijms232415961>.

- (118) Kawakami, Y.; Inoue, A.; Kawai, T.; Wakita, M.; Sugimoto, H.; Hopfinger, A. J. The Rationale for E2020 as a Potent Acetylcholinesterase Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4* (9), 1429–1446. [https://doi.org/10.1016/0968-0896\(96\)00137-X](https://doi.org/10.1016/0968-0896(96)00137-X).
- (119) Xie, H.; Wen, H.; Qin, M.; Xia, J.; Zhang, D.; Liu, L.; Liu, B.; Liu, Q.; Jin, Q.; Chen, X. In Silico Drug Repositioning for the Treatment of Alzheimer's Disease Using Molecular Docking and Gene Expression Data. *RSC Adv.* **2016**, *6* (100), 98080–98090. <https://doi.org/10.1039/C6RA21941A>.
- (120) Rathi, K.; Wavhale, R.; Bhole, R.; Undale, V.; Chaudhari, S. Rational Drug Repurposing for Alzheimer's Treatment Using in-Silico Ligand and Structure-Based Approaches. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2024**, *60*, e23618. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902024e23618>.
- (121) Qiu, Y.; Cheng, F. Artificial Intelligence for Drug Discovery and Development in Alzheimer's Disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2024**, *85*, 102776. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2024.102776>.
- (122) Zhang, J.; Zhang, Y.; Wang, J.; Xia, Y.; Zhang, J.; Chen, L. Recent Advances in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Clinical Trials and New Drug Development Strategies. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9* (1), 211. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01911-3>.
- (123) Ivanova, L.; Karelson, M.; Dobchev, D. A. Multitarget Approach to Drug Candidates against Alzheimer's Disease Related to AChE, SERT, BACE1 and GSK3 β Protein Targets. *Molecules* **2020**, *25* (8), 1846. <https://doi.org/10.3390/molecules25081846>.
- (124) Fang, J.; Li, Y.; Liu, R.; Pang, X.; Li, C.; Yang, R.; He, Y.; Lian, W.; Liu, A.-L.; Du, G.-H. Discovery of Multitarget-Directed Ligands against Alzheimer's Disease through Systematic Prediction of Chemical–Protein Interactions. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (1), 149–164. <https://doi.org/10.1021/ci500574n>.
- (125) Espargaró, A.; Ginex, T.; Vadell, M. D. M.; Busquets, M. A.; Estelrich, J.; Muñoz-Torrero, D.; Luque, F. J.; Sabate, R. Combined in Vitro Cell-Based/in Silico Screening of Naturally Occurring Flavonoids and Phenolic Compounds as Potential Anti-Alzheimer Drugs. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (2), 278–289. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00643>.
- (126) Sang, Z.; Wang, K.; Shi, J.; Liu, W.; Tan, Z. Design, Synthesis, in-Silico and Biological Evaluation of Novel Chalcone-O-Carbamate Derivatives as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *178*, 726–739. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.026>.
- (127) Erdogan Orhan, I.; Deniz, F. S. S.; Salmas, R. E.; Irmak, S.; Acar, O. O.; Turgut, G. C.; Sen, A.; Zbancioc, A.; Luca, S. V.; Skiba, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Tataranga, G. Evaluation of Anti-Alzheimer Activity of Synthetic Coumarins by Combination of *in Vitro* and *in Silico* Approaches. *Chem. Biodivers.* **2022**, *19* (12), e202200315. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200315>.
- (128) Ramya Sree, D.; Boyina, H. In Silico Screening and Molecular Docking of Flavonoids against the Alzheimer's Disease Using ACHE, BACE1 and Tau Protein Targets. *J. Neurol. Sci.* **2023**, *455*, 122116. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2023.122116>.

- (129) Vrabec, R.; Blunden, G.; Cahlíková, L. Natural Alkaloids as Multi-Target Compounds towards Factors Implicated in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (5), 4399. <https://doi.org/10.3390/ijms24054399>.
- (130) Santos, Y. J. A. Uso de Ferramentas in Sílico de Substâncias Utilizadas No Tratamento Da Doença de Alzheimer. *31° Encontro Iniciaç. Científica UFS* **2021**.
- (131) Bento, A. P.; Gaulton, A.; Hersey, A.; Bellis, L. J.; Chambers, J.; Davies, M.; Krüger, F. A.; Light, Y.; Mak, L.; McGlinchey, S.; Nowotka, M.; Papadatos, G.; Santos, R.; Overington, J. P. The ChEMBL Bioactivity Database: An Update. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (D1), D1083–D1090. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1031>.
- (132) Liu, T.; Lin, Y.; Wen, X.; Jorissen, R. N.; Gilson, M. K. BindingDB: A Web-Accessible Database of Experimentally Determined Protein-Ligand Binding Affinities. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (Database), D198–D201. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl999>.
- (133) Goodarzi, M.; Dejaegher, B.; Heyden, Y. V. Feature Selection Methods in QSAR Studies. *J. AOAC Int.* **2012**, *95* (3), 636–651. https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE_Goodarzi.
- (134) Gonzalez, M.; Teran, C.; Saiz-Urra, L.; Teijeira, M. Variable Selection Methods in QSAR: An Overview. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8* (18), 1606–1627. <https://doi.org/10.2174/156802608786786552>.
- (135) Kim, J. H. Multicollinearity and Misleading Statistical Results. *Korean J. Anesthesiol.* **2019**, *72* (6), 558–569. <https://doi.org/10.4097/kja.19087>.
- (136) Cheng, J.; Sun, J.; Yao, K.; Xu, M.; Cao, Y. A Variable Selection Method Based on Mutual Information and Variance Inflation Factor. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2022**, *268*, 120652. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120652>.
- (137) Pourbasheer, E.; Ahmadpour, S.; Zare-Dorabei, R.; Nekoei, M. Quantitative Structure Activity Relationship Study of P38 α MAP Kinase Inhibitors. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10* (1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.05.009>.
- (138) Bzovsky, S.; Phillips, M. R.; Guymer, R. H.; Wykoff, C. C.; Thabane, L.; Bhandari, M.; Chaudhary, V.; R.E.T.I.N.A. study group. The Clinician's Guide to Interpreting a Regression Analysis. *Eye Lond. Engl.* **2022**, *36* (9), 1715–1717. <https://doi.org/10.1038/s41433-022-01949-z>.
- (139) Markovsky, I.; Van Huffel, S. Overview of Total Least-Squares Methods. *Signal Process.* **2007**, *87* (10), 2283–2302. <https://doi.org/10.1016/j.sigpro.2007.04.004>.
- (140) Meshram, S. G.; Safari, M. J. S.; Khosravi, K.; Meshram, C. Iterative Classifier Optimizer-Based Pace Regression and Random Forest Hybrid Models for Suspended Sediment Load Prediction. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2021**, *28* (9), 11637–11649. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11335-5>.
- (141) Wang, Y.; Witten, I. *Pace Regression*; University of Waikato, Department of Computer Science: Hamilton, New Zealand, 1999. <https://hdl.handle.net/10289/1041>.
- (142) Alencar, D.; Carvalho, D.; Koenders, E.; Mourão, F.; Rocha, L. Devising a Computational Model Based on Data Mining Techniques to Predict

- Concrete Compressive Strength. *Procedia Comput. Sci.* **2017**, *108*, 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2017.05.018>.
- (143) Wang, Y.; Witten, I. H. Modeling for Optimal Probability Prediction. *Proc. Ninet. Int. Conf. Mach. Learn.* **2002**, No. December 2002, 650–657.
- (144) Wang, Y. A New Approach to Fitting Linear Models in High Dimensional Spaces, 2000, Vol. 1994.
- (145) Aitkin, M.; Foxall, R. Statistical Modelling of Artificial Neural Networks Using the Multi-Layer Perceptron. *Stat. Comput.* **2003**, *13* (3), 227–239. <https://doi.org/10.1023/A:1024218716736>.
- (146) Madhiarasan, M.; Louzazni, M. Analysis of Artificial Neural Network: Architecture, Types, and Forecasting Applications. *J. Electr. Comput. Eng.* **2022**, 2022 (i), 1–23. <https://doi.org/10.1155/2022/5416722>.
- (147) Pinkus, A. Approximation Theory of the MLP Model in Neural Networks. *Acta Numer.* **1999**, *8* (November 2008), 143–195. <https://doi.org/10.1017/S0962492900002919>.
- (148) Du, K.-L.; Swamy, M. N. S. *Neural Networks and Statistical Learning*; Springer London: London, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5571-3>.
- (149) Kumar, Y.; Sahoo, G. Analysis of Parametric & Non Parametric Classifiers for Classification Technique Using WEKA. *Int. J. Inf. Technol. Comput. Sci.* **2012**, *4* (7), 43–49. <https://doi.org/10.5815/ijitcs.2012.07.06>.
- (150) Bohra, P.; Palivela, H. Understanding and Formulation of Various Kernel Techniques for Support Vector Machines. In *2015 IEEE International Conference on Computational Intelligence and Computing Research (ICCIC)*; IEEE: Madurai, India, 2015; pp 1–6. <https://doi.org/10.1109/ICCIC.2015.7435804>.
- (151) Murty, M. N.; Raghava, R. Kernel-Based SVM. In *Support Vector Machines and Perceptrons*; SpringerBriefs in Computer Science; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 57–67. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41063-0_5.
- (152) Kaestner, C. A. A. Support Vector Machines and Kernel Functions for Text Processing. *Rev. Informática Teórica E Apl.* **2013**, *20* (3), 130. <https://doi.org/10.22456/2175-2745.39702>.
- (153) Hao, P. Y. Pair-v-SVR: A Novel and Efficient Pairing Nu-Support Vector Regression Algorithm. *IEEE Trans. Neural Netw. Learn. Syst.* **2017**, *28* (11), 2503–2515. <https://doi.org/10.1109/TNNLS.2016.2598182>.
- (154) Mohammed Rashid, A.; Midi, H.; Dhhan, W.; Arasan, J. Detection of Outliers in High-Dimensional Data Using Nu -Support Vector Regression. *J. Appl. Stat.* **2022**, *49* (10), 2550–2569. <https://doi.org/10.1080/02664763.2021.1911965>.
- (155) Balfer, J.; Bajorath, J. Systematic Artifacts in Support Vector Regression-Based Compound Potency Prediction Revealed by Statistical and Activity Landscape Analysis. *PLOS ONE* **2015**, *10* (3), e0119301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119301>.
- (156) Schölkopf, B.; Smola, A. J.; Williamson, R. C.; Bartlett, P. L. New Support Vector Algorithms. *Neural Comput.* **2000**, *12* (5), 1207–1245. <https://doi.org/10.1162/089976600300015565>.
- (157) Wu, J.; Wang, Y. G. A Working Likelihood Approach to Support Vector Regression with a Data-Driven Insensitivity Parameter. *Int. J. Mach.*

- Learn. Cybern.* **2023**, *14* (3), 929–945. <https://doi.org/10.1007/s13042-022-01672-x>.
- (158) Chang, C.-C.; Lin, C.-J. LIBSVM: A Library for Support Vector Machines. *ACM Trans. Intell. Syst. Technol.* **2007**, *2*.
 - (159) Varsou, D.-D.; Nikolakopoulos, S.; Tsoumanis, A.; Melagraki, G.; Afantitis, A. Enalos+ KNIME Nodes: New Cheminformatics Tools for Drug Discovery. In *Rational Drug Design*; Mavromoustakos, T., Kellici, T. F., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 1824, pp 113–138. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8630-9_7.
 - (160) Afantitis, A.; Melagraki, G.; Sarimveis, H.; Koutentis, P. A.; Markopoulos, J.; Igglessi-Markopoulou, O. Development and Evaluation of a QSPR Model for the Prediction of Diamagnetic Susceptibility. *QSAR Comb. Sci.* **2008**, *27* (4), 432–436. <https://doi.org/10.1002/qsar.200730083>.
 - (161) Melagraki, G.; Afantitis, A.; Sarimveis, H.; Koutentis, P. A.; Kollias, G.; Igglessi-Markopoulou, O. Predictive QSAR Workflow for the in Silico Identification and Screening of Novel HDAC Inhibitors. *Mol. Divers.* **2009**, *13* (3), 301–311. <https://doi.org/10.1007/s11030-009-9115-2>.
 - (162) Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol. Inform.* **2010**, *29* (6–7), 476–488. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>.
 - (163) Tropsha, A.; Gramatica, P.; Gombar, V. K. The Importance of Being Earnest: Validation Is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22* (1), 69–77. <https://doi.org/10.1002/QSAR.200390007>.
 - (164) Golbraikh, A.; Tropsha, A. *Predictive QSAR Modeling Based on Diversity Sampling of Experimental Datasets for the Training and Test Set Selection*; 2002; Vol. 16, pp 357–369.
 - (165) Melagraki, G.; Afantitis, A. Enalos InSilicoNano Platform: An Online Decision Support Tool for the Design and Virtual Screening of Nanoparticles. *RSC Adv* **2014**, *4* (92), 50713–50725. <https://doi.org/10.1039/C4RA07756C>.
 - (166) Lipiński, P. F. J.; Szurmak, P. SCRAMBLE'N'GAMBLE: A Tool for Fast and Facile Generation of Random Data for Statistical Evaluation of QSAR Models. *Chem. Pap.* **2017**, *71* (11), 2217–2232. <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0215-7>.
 - (167) Shayanfar, S.; Shayanfar, A. Comparison of Various Methods for Validity Evaluation of QSAR Models. *BMC Chem.* **2022**, *16* (1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00856-4>.
 - (168) Veerasamy, R.; Rajak, H.; Jain, A.; Sivadasan, S.; Varghese, C. P.; Agrawal, R. K. Validation of QSAR Models - Strategies and Importance. *Int. J. Drug Des. Discovery* **2011**, *2* (3), 511–519.
 - (169) Mena-Ulecia, K.; Tiznado, W.; Caballero, J. Study of the Differential Activity of Thrombin Inhibitors Using Docking, QSAR, Molecular Dynamics, and MM-GBSA. *PLOS ONE* **2015**, *10* (11), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142774>.
 - (170) Ramírez, D.; Caballero, J. Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available

- Structural Data? *Molecules* **2018**, *23* (5), 1038. <https://doi.org/10.3390/molecules23051038>.
- (171) Stanciu, G. D.; Luca, A.; Rusu, R. N.; Bild, V.; Beschea Chiriac, S. I.; Solcan, C.; Bild, W.; Ababei, D. C. Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. *Biomolecules* **2019**, *10* (1), 40. <https://doi.org/10.3390/biom10010040>.
- (172) Ma, K.-G.; Qian, Y.-H. Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Its Effects on Alzheimer's Disease. *Neuropeptides* **2019**, *73* (2019), 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.12.003>.
- (173) Genheden, S.; Reymer, A.; Saenz-Méndez, P.; Eriksson, L. A. Computational Chemistry and Molecular Modelling Basics. In *Computational Tools for Chemical Biology*; Martín-Santamaría, S., Ed.; The Royal Society of Chemistry, 2017; pp 1–38. <https://doi.org/10.1039/9781788010139-00001>.
- (174) Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17* (5–6), 490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P).
- (175) Halgren, T. A. MMFF VI. MMFF94s Option for Energy Minimization Studies. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20* (7), 720–729. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199905\)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199905)20:7<720::AID-JCC7>3.0.CO;2-X).
- (176) Halgren, T. a. Merck Molecular Force Field. *J Comput Chem* **1996**, *17* (5–6), 490–519.
- (177) Martin, B. P.; Brandon, C. J.; Stewart, J. J. P.; Braun-Sand, S. B. Accuracy Issues Involved in Modeling in Vivo Protein Structures Using PM7. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2015**, *83* (8), 1427–1435. <https://doi.org/10.1002/prot.24826>.
- (178) O'Boyle, N. M. Towards a Universal SMILES Representation - A Standard Method to Generate Canonical SMILES Based on the InChI. *J. Cheminformatics* **2012**, *4* (9), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-22>.
- (179) Rácz, A.; Bajusz, D.; Héberger, K. Intercorrelation Limits in Molecular Descriptor Preselection for QSAR/QSPR. *Mol. Inform.* **2019**, *38* (8–9), 1800154. <https://doi.org/10.1002/minf.201800154>.
- (180) Todeschini, R.; Consonni, V. *Handbook of Molecular Descriptors; Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; Wiley, 2000. <https://doi.org/10.1002/9783527613106>.
- (181) Uddin, S.; Khan, A.; Hossain, M. E.; Moni, M. A. Comparing Different Supervised Machine Learning Algorithms for Disease Prediction. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* **2019**, *19* (1), 281. <https://doi.org/10.1186/s12911-019-1004-8>.
- (182) Wolters, M. A. kofnGA: A Genetic Algorithm for Fixed-Size Subset Selection, 2014, 1.3. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.kofnGA>.
- (183) Liu, S.; Cao, C.; Li, Z. Approach to Estimation and Prediction for Normal Boiling Point (NBP) of Alkanes Based on a Novel Molecular Distance-Edge (MDE) Vector, λ. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1998**, *38* (3), 387–394. <https://doi.org/10.1021/ci970109z>.

- (184) Mauri, A. alvaDesc: A Tool to Calculate and Analyze Molecular Descriptors and Fingerprints. In *Methods in Pharmacology and Toxicology*; 2020; pp 801–820. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0150-1_32.
- (185) Lu, X.; Shi, L.; Zhou, J. Quantitative Structure–Activity Relationship Study of Bisphosphonates. *Internet Electron. J. Mol. Des.* **2004**, 3, 622–650.
- (186) Wildman, S. A.; Crippen, G. M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, 39 (5), 868–873. <https://doi.org/10.1021/ci990307l>.
- (187) Reutlinger, M.; Koch, C. P.; Reker, D.; Todoroff, N.; Schneider, P.; Rodrigues, T.; Schneider, G. Chemically Advanced Template Search (CATS) for Scaffold-Hopping and Prospective Target Prediction for ‘Orphan’ Molecules. *Mol. Inform.* **2013**, 32 (2), 133–138. <https://doi.org/10.1002/minf.201200141>.
- (188) Lipton, S. A. Paradigm Shift in NMDA Receptor Antagonist Drug Development: Molecular Mechanism of Uncompetitive Inhibition by Memantine in the Treatment of Alzheimer ’ s Disease and Other Neurologic Disorders. *J. Alzheimers Dis.* **2004**, 6, 61–74.
- (189) Nelson, J. K.; Frølund, S. U.; Tikhonov, D. B.; Kristensen, A. S.; Strømgaard, K. Synthesis and Biological Activity of Argitoxin 636 and Analogues: Selective Antagonists for Ionotropic Glutamate Receptors. *Angew. Chem.* **2009**, 121 (17), 3133–3137. <https://doi.org/10.1002/ange.200805426>.
- (190) Nikam, S.; Meltzer, L. NR2B Selective NMDA Receptor Antagonists. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, 8 (10), 845–855. <https://doi.org/10.2174/1381612024607072>.
- (191) Nath, A.; Roy, K. Chemometric Modeling of Acute Toxicity of Diverse Aromatic Compounds against Rana Japonica. *Toxicol. In Vitro* **2022**, 83, 105427. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105427>.
- (192) Todeschini, R.; Consonni, V. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics*, 2nd ed., revised and enlarged.; Methods and principles in medicinal chemistry; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.
- (193) McDonald, I. A.; Cosford, N.; Vernier, J.-M. Chapter 5. Nicotinic Acetylcholine Receptors: Molecular Biology, Chemistry and Pharmacology. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; 1995; pp 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)60918-5](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)60918-5).
- (194) Papke, R. L.; Quadri, M.; Gulsevin, A. Silent Agonists for A7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol. Res.* **2023**, 190 (December 2022), 106736. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106736>.
- (195) Schapira, M.; Abagyan, R.; Totrov, M. Structural Model of Nicotinic Acetylcholine Receptor Isoforms Bound Toacetylcholine and Nicotine. *BMC Struct. Biol.* **2002**, 2, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-2-1>.
- (196) Celie, P. H. N.; van Rossum-Fikkert, S. E.; van Dijk, W. J.; Brejc, K.; Smit, A. B.; Sixma, T. K. Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures. *Neuron* **2004**, 41 (6), 907–914. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00115-1).
- (197) Auerbach, A. Agonist Activation of a Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Neuropharmacology* **2015**, 96 (0 0), 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.004>.

- (198) Papke, R. L.; Chojnacka, K.; Horenstein, N. A. The Minimal Pharmacophore for Silent Agonism of the A7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, 350 (3), 665–680. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.215236>.
- (199) Zapadka, M.; Dekowski, P.; Kupcewicz, B. HATS5m as an Example of GETAWAY Molecular Descriptor in Assessing the Similarity/Diversity of the Structural Features of 4-Thiazolidinone. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23 (12), 6576. <https://doi.org/10.3390/ijms23126576>.
- (200) Helguera, A.; Combes, R.; Gonzalez, M.; Cordeiro, M. N. Applications of 2D Descriptors in Drug Design: A DRAGON Tale. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, 8 (18), 1628–1655. <https://doi.org/10.2174/156802608786786598>.
- (201) Chayawan; Selvestrel, G.; Baderna, D.; Toma, C.; Caballero Alfonso, A. Y.; Gamba, A.; Benfenati, E. Skin Sensitization Quantitative QSAR Models Based on Mechanistic Structural Alerts. *Toxicology* **2022**, 468 (January), 153111. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153111>.
- (202) Devinyak, O.; Havrylyuk, D.; Lesyk, R. 3D-MoRSE Descriptors Explained. *J. Mol. Graph. Model.* **2014**, 54, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.10.006>.
- (203) Colović, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Vasić, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, 11 (3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>.
- (204) Viegas, C.; Bolzani, V. S.; Pimentel, L. S. B.; Castro, N. G.; Cabral, R. F.; Costa, R. S.; Floyd, C.; Rocha, M. S.; Young, M. C. M.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. New Selective Acetylcholinesterase Inhibitors Designed from Natural Piperidine Alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13 (13), 4184–4190. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.030>.
- (205) Barbosa Filho, J. M.; Medeiros, K. C. P.; Diniz, M. de F. F. M.; Batista, L. M.; Athayde-Filho, P. F.; Silva, M. S.; Cunha, E. V. L. da; Almeida, J. R. G. S.; Quintans-Júnior, L. J. Natural Products Inhibitors of the Enzyme Acetylcholinesterase. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 258–285. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200021>.
- (206) Santos, T. C. D.; Gomes, T. M.; Pinto, B. A. S.; Camara, A. L.; Paes, A. M. D. A. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. *Front. Pharmacol.* **2018**, 9, 1192. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01192>.
- (207) Peitzika, S.-C.; Pontiki, E. A Review on Recent Approaches on Molecular Docking Studies of Novel Compounds Targeting Acetylcholinesterase in Alzheimer Disease. *Mol. Basel Switz.* **2023**, 28 (3), 1084. <https://doi.org/10.3390/molecules28031084>.
- (208) Jang, C.; Yadav, D. K.; Subedi, L.; Venkatesan, R.; Venkanna, A.; Afzal, S.; Lee, E.; Yoo, J.; Ji, E.; Kim, S. Y.; Kim, M. Identification of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors Designed by Pharmacophore-Based Virtual Screening, Molecular Docking and Bioassay. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 14921. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33354-6>.
- (209) Kar, S.; Roy, K.; Leszczynski, J. Applicability Domain: A Step Toward Confident Predictions and Decidability for QSAR Modeling. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2018; Vol. 1800, pp 141–169. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7899-1_6.

- (210) Roy, K.; Ambure, P.; Kar, S. How Precise Are Our Quantitative Structure–Activity Relationship Derived Predictions for New Query Chemicals? *ACS Omega* **2018**, *3* (9), 11392–11406. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01647>.
- (211) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- (212) Liew, S. Y.; Mak, W. Q.; Thew, H. Y.; Khaw, K. Y.; Hazni, H.; Litaudon, M.; Awang, K. Neuroprotective Activities of New Monoterpenoid Indole Alkaloid from *Nauclea Officinalis*. *Processes* **2023**, *11* (3), 646. <https://doi.org/10.3390/pr11030646>.
- (213) Li, S.; Han, L.-L.; Huang, K.-P.; Ma, Y.-H.; Guo, L.-L.; Guo, Y.; Ran, X.; Yao, Y.-G.; Hao, X.-J.; Luo, R.; Zhang, Y. New Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Tabernaemontana Crassa* Inhibit β -Amyloid₄₂ Production and Phospho-Tau (Thr217). *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (2), 1487. <https://doi.org/10.3390/ijms24021487>.
- (214) Passos, C. S.; Simões-Pires, C. A.; Nurisso, A.; Soldi, T. C.; Kato, L.; De Oliveira, C. M. A.; De Faria, E. O.; Marcourt, L.; Gottfried, C.; Carrupt, P.-A.; Henriques, A. T. Indole Alkaloids of *Psychotria* as Multifunctional Cholinesterases and Monoamine Oxidases Inhibitors. *Phytochemistry* **2013**, *86*, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.015>.
- (215) Rezaul Islam, M.; Akash, S.; Murshedul Islam, M.; Sarkar, N.; Kumer, A.; Chakraborty, S.; Dhama, K.; Ahmed Al-Shaeri, M.; Anwar, Y.; Wilairatana, P.; Rauf, A.; Halawani, I. F.; Alzahrani, F. M.; Khan, H. Alkaloids as Drug Leads in Alzheimer's Treatment: Mechanistic and Therapeutic Insights. *Brain Res.* **2024**, *1834* (February), 148886. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2024.148886>.
- (216) Papke, R. L.; Schiff, H. C.; Jack, B. A.; Horenstein, N. A. Molecular Dissection of Tropisetron, an A₇ Nicotinic Acetylcholine Receptor-Selective Partial Agonist. *Neurosci. Lett.* **2005**, *378* (3), 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.12.025>.
- (217) Wąsik, A.; Antkiewicz-Michaluk, L. The Mechanism of Neuroprotective Action of Natural Compounds. *Pharmacol. Rep.* **2017**, *69* (5), 851–860. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.018>.
- (218) Seidl, C.; Santos, C. A. D. M.; Simone, A. D.; Bartolini, M.; Weffort-Santos, A. M.; Andrisano, V. Uleine Disrupts Key Enzymatic and Non-Enzymatic Biomarkers That Leads to Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2017**, *14* (3), 317–326. <https://doi.org/10.2174/1567205013666161026150455>.
- (219) Dos Santos Passos, C.; Klein-Júnior, L. C.; De Mello Andrade, J. M.; Matté, C.; Henriques, A. T. The Catechol-O-Methyltransferase Inhibitory Potential of Z-Vallesiachotamine by in Silico and in Vitro Approaches. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, *25* (4), 382–386. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.002>.
- (220) Konrath, E. L.; Passos, C. D. S.; Klein-Júnior, L. C.; Henriques, A. T. Alkaloids as a Source of Potential Anticholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65* (12), 1701–1725. <https://doi.org/10.1111/jphp.12090>.

- (221) Akotkar, L.; Aswar, U.; Ganeshpurkar, A.; Raj, R.; Pawar, A. An Overview of Chemistry, Kinetics, Toxicity and Therapeutic Potential of Boldine in Neurological Disorders. *Neurochem. Res.* **2023**, *48* (11), 3283–3295. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03992-y>.
- (222) Khizrieva, S. S.; Borisenko, S. N.; Maksimenko, E. V.; Vetrova, E. V.; Borisenko, N. I.; Minkin, V. I. Antioxidant Properties and Effects of Aporphine Alkaloids and Their Phenanthrene Seco-Isomers on Acetylcholinesterase Activity. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2022**, *48* (7), 1433–1440. <https://doi.org/10.1134/S106816202207010X>.
- (223) Baky, M.; Abouelela, M. Boldine Alkaloid: Holistic Overview on Potential Health Benefits and Medicinal Merits a Comprehensive Review. *ERU Res. J.* **2022**, *1* (1), 2–30. <https://doi.org/10.21608/erurj.2022.265248>.
- (224) Tuzimski, T.; Petruczynik, A. Determination of Anti-Alzheimer's Disease Activity of Selected Plant Ingredients. *Molecules* **2022**, *27* (10), 3222. <https://doi.org/10.3390/molecules27103222>.
- (225) Galarce-Bustos, O.; Pavón, J.; Henríquez-Aedo, K.; Aranda, M. Detection and Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors in *ANNONA CHERIMOLA* Mill. by Effect-directed Analysis Using Thin-layer Chromatography-bioassay-mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* **2019**, *30* (6), 679–686. <https://doi.org/10.1002/pca.2843>.
- (226) M. N. H. W. Salleh, W.; A. Nafiah, M.; H. Jauri, M.; Khamis, S. Chemical Constituents and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of *Beilschmiedia Insignis* Gamble. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2022**, *35* (3), 685–691. <https://doi.org/10.4314/bcse.v35i3.19>.
- (227) Hung, T.; Dang, N.; Kim, J.; Jang, H.-S.; Ryoo, S.-W.; Lee, J.; Choi, J.; Bae, K.; Min, B. Alkaloids from Roots of *Stephania Rotunda* and Their Cholinesterase Inhibitory Activity. *Planta Med.* **2010**, *76* (15), 1762–1764. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249814>.
- (228) Liebeschuetz, J. W.; Cole, J. C.; Korb, O. Pose Prediction and Virtual Screening Performance of GOLD Scoring Functions in a Standardized Test. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26* (6), 737–748. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9551-4>.
- (229) Singh, N.; Villoutreix, B. O. A Hybrid Docking and Machine Learning Approach to Enhance the Performance of Virtual Screening Carried out on Protein–Protein Interfaces. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (22), 14364. <https://doi.org/10.3390/ijms232214364>.
- (230) Korb, O.; Stützle, T.; Exner, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (1), 84–96. <https://doi.org/10.1021/ci800298z>.
- (231) Mooij, W. T. M.; Verdonk, M. L. General and Targeted Statistical Potentials for Protein–Ligand Interactions. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, *61* (2), 272–287. <https://doi.org/10.1002/prot.20588>.
- (232) Li, S.-X.; Huang, S.; Bren, N.; Noridomi, K.; Dellisanti, C. D.; Sine, S. M.; Chen, L. Ligand-Binding Domain of an A7-Nicotinic Receptor Chimera and Its Complex with Agonist. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14* (10), 1253–1259. <https://doi.org/10.1038/nn.2908>.
- (233) Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important

Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (22), 10282–10286.
<https://doi.org/10.1021/jm300871x>.