

## POTENCIAL DE INTERAÇÃO ENTRE SELENOTRIAZÓIS DERIVADOS DE CUMARINA E ACETILCOLINESTERASE: ESTUDOS *IN SILICO* E *IN VITRO*

LUANA RAATZ KLUG<sup>1</sup>; TÁCIA KATIANE HALL<sup>2</sup>; CRISTAL VIRGINIA TENÓRIO MARTINS<sup>3</sup>; LUANA DA SILVA MAGALHÃES FOREZI<sup>3</sup>; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING<sup>4</sup>; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – luana.klug@ufpel.edu.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – taciahall26@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal Fluminense – cristalvirginia@id.uff.br

<sup>3</sup>Universidade Federal Fluminense – luanaforezi@id.uff.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – cabruning@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – cbortolatto@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima fundamental na regulação da neurotransmissão colinérgica, responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. Inibidores da AChE são empregados clinicamente em diversas patologias, como miastenia gravis, glaucoma e, especialmente, na doença de Alzheimer (DA), condições nas quais se busca atenuar a perda de função colinérgica (LLANES et al., 2023; LUQUE; MUNOZ-TORRERO, 2024).

A DA é uma enfermidade neurodegenerativa progressiva caracterizada pela perda seletiva de neurônios colinérgicos, especialmente nas regiões do hipocampo e córtex cerebral, na qual ocorre a diminuição dos níveis de ACh comprometendo severamente a plasticidade sináptica e os processos de memória. A inibição da AChE atua como uma estratégia compensatória, prolongando a disponibilidade de ACh na fenda sináptica e promovendo uma melhora temporária dos sintomas cognitivos (LLANES et al., 2023; LUQUE; MUNOZ-TORRERO, 2024). No entanto, os inibidores atualmente aprovados possuem eficácia limitada e estão associados a efeitos colaterais, como distúrbios gastrointestinais e bradicardia, além de apresentarem baixa seletividade e curta meia-vida.

Nesse contexto, o desenvolvimento de novos compostos inibidores de AChE representa uma estratégia promissora. Entre as estruturas químicas de interesse para o desenvolvimento de candidatos terapêuticos, destacam-se os organosselênicos e os derivados de cumarina. Compostos orgânicos de selênio vêm sendo investigados por suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e moduladoras de colinesterases, além de provavelmente apresentarem capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (PINTO et al., 2021; NOGUEIRA; ROCHA, 2011). Já os derivados cumarínicos demonstram afinidade por regiões catalíticas e periféricas da AChE, podendo interferir também na agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide, outro fator patológico da DA (KIM et al., 2020; PERIN et al., 2022). Assim, compostos contendo essas unidades estruturais apresentam potencial para atuação multifuncional em distúrbios neurodegenerativos. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar, por meio de ensaios *in vitro* e *in silico*, o potencial de interação de doze compostos sintéticos da classe dos selenotriazóis derivados de cumarina com a AChE.

### 2. METODOLOGIA

**Compostos:** Os compostos **7a–7l**, pertencentes à classe dos selenotriazóis derivados de cumarina, utilizados neste estudo, foram sintetizados no Laboratório

de Síntese Orgânica Aplicada (LABSOA) da Universidade Federal Fluminense (UFF). Para os ensaios *in vitro*, os compostos foram previamente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO).

**Animais:** Camundongos Swiss foram utilizados para a obtenção de tecido cerebral para o ensaio *in vitro*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da UFPEL (CEUA/UFPEL: 022515/2023-13).

**Análise de docking molecular:** As estruturas dos compostos foram preparadas no ChemDraw, Avogadro e AutoDockTools. A estrutura da AChE (PDB: 4PQE) foi obtida do Protein Data Bank e processada no Chimera. As interações dos compostos com a AChE foram avaliadas por docking molecular utilizando o AutoDock Vina. As simulações foram realizadas em triplicata, e as interações moleculares analisadas no Discovery Studio 2016.

**Atividade da AChE cerebral *in vitro*:** Os cérebros foram homogeneizados (1:10, p/v) em tampão contendo 0,32 M de sacarose, 5 mM de Tris-HCl e 0,1 mM de EDTA, e centrifugados a 900×g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi ajustada para 0,8 mg/mL (BRADFORD, 1976). A atividade da AChE foi avaliada segundo o método de Ellman (1961), com modificações, utilizando acetiltiocolina como substrato. As amostras foram incubadas com os compostos (7a–7l) a 50 µM, e a reação iniciada com 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico (DTNB, 10 mM) e acetiltiocolina (8 mM), sendo monitorada a 412 nm por 2 minutos. Os resultados foram expressos em µmol/h/mg de proteína. A rivastigmina (200 µM, um inibidor da AChE) foi utilizada como controle positivo. Os ensaios foram realizados em duplicata e conduzidos em três dias distintos (n = 3). Os dois compostos mais ativos foram selecionados para testes com curvas de concentração–resposta (1 a 50 µM).

**Análise estatística:** A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8.0.2, com os resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

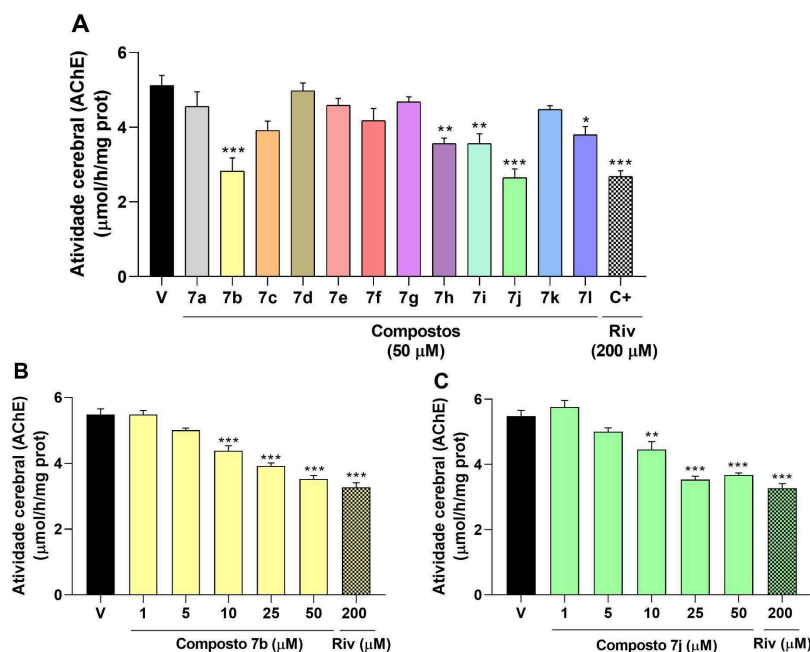
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima AChE é um dos principais alvos terapêuticos na DA, sendo amplamente estudada devido ao seu papel fundamental na regulação da neurotransmissão colinérgica. Com o objetivo de identificar potenciais inibidores dessa enzima, foi realizada uma abordagem integrada envolvendo *docking* molecular e ensaios bioquímicos *in vitro* com doze derivados cumarínicos contendo selênio (7a–l).

**Tabela 1.** Pontuações de encaixe molecular de compostos em relação à AChE.

Pontuações de encaixe para cada composto (Kcal/mol)			
<b>7a</b> -9,6	<b>7d</b> -9,8	<b>7g</b> -9,8	<b>7j</b> -9,6
<b>7b</b> -9,9	<b>7e</b> -9,8	<b>7h</b> -9,7	<b>7k</b> -9,7
<b>7c</b> -9,8	<b>7f</b> -9,8	<b>7i</b> -9,7	<b>7l</b> -9,2
Rivastigmina -7,3			

Inicialmente, a análise de *docking* molecular foi conduzida para prever a afinidade dos compostos pelo sítio ativo da AChE. Todos apresentaram energias de ligação favoráveis, variando de -9,2 a -9,9 kcal/mol, indicando bom potencial de interação com a enzima, superior à da rivastigmina. Os compostos **7b** (-9,9) e **7j** (-9,6) se destacaram entre os demais e foram priorizados para as etapas experimentais subsequentes.



**Figura 1.** Efeitos dos compostos da classe dos selenotriazóis derivados de cumarina sobre a atividade da AChE cerebral *in vitro*. (1A) Ensaio de inibição da atividade da AChE com todos os compostos **7a-l** a 50 µM. (1B) Curva concentração-resposta do composto **7b**. (1C) Curva concentração-resposta do composto **7j**. Rivastigmina (200 µM) foi usada como controle positivo. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes com duplicatas (n = 3). Os resultados são expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada usando ANOVA unidirecional seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. (\*)  $p \leq 0,05$ , (\*\*)  $p \leq 0,01$ , (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  em comparação com o grupo veículo (V).

A triagem *in vitro* (Figura 1A), realizada com os doze compostos na concentração de 50 µM, revelou que cinco deles (**7b**, **7h**, **7i**, **7j** e **7l**) inibiram significativamente a atividade da AChE cerebral. Dentre esses, os compostos **7b** e **7j** apresentaram os efeitos mais expressivos, com inibição altamente significativa em relação ao grupo veículo ( $p \leq 0,001$ ) [ $F_{(13, 28)}=11,44$ ;  $p \leq 0,0001$ ]. O controle positivo rivastigmina (200 µM) também reduziu significativamente a atividade enzimática ( $p \leq 0,001$ ).

Com base nesses achados, os compostos **7b** e **7j** foram selecionados para análises de curvas concentração-resposta (1 a 50 µM). Conforme mostrado nas Figuras 1B [ $F_{(6, 21)}=51,88$ ;  $p \leq 0,0001$ ] e 1C [ $F_{(6, 21)}=38,40$ ;  $p \leq 0,0001$ ], ambos apresentaram inibição significativa da AChE, com efeitos observados a partir de 10 µM e mantidos até 50 µM. Salienta-se que maiores concentrações não foram testadas devido a dificuldades com a solubilidade no meio reacional. Além disso, é possível verificar que os compostos demonstraram atividade comparável à da rivastigmina, porém em concentrações inferiores, sugerindo maior potência.

A eficácia observada pode estar relacionada à presença do Se, elemento com propriedades neuroprotetoras e capacidade de interagir com centros catalíticos (PINTO et al., 2021; NOGUEIRA; ROCHA, 2011). A estrutura cumarínica também favorece a interação com a AChE por meio de interações  $\pi$ - $\pi$  com resíduos aromáticos no sítio ativo, além de conferir propriedades multiativo, desejáveis no tratamento de doenças neurodegenerativas (KIM et al., 2020; PERIN et al., 2022). O sinergismo entre o núcleo cumarínico e o átomo de Se pode favorecer o encaixe simultâneo nos sítios catalítico e periférico da AChE, como sugerido pelas simulações de *docking*, contribuindo para o bloqueio da hidrólise da ACh. Assim, os compostos **7b** e **7j** se destacam como candidatos promissores ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para a DA, justificando investigações futuras em modelos celulares e *in vivo*.

#### 4. CONCLUSÕES

Os compostos selenotriazóis derivados de cumarina **7b** e **7j** apresentaram inibição significativa da AChE mesmo em baixas concentrações, aliada a perfis de *docking* molecular favoráveis de interação entre o composto e o sítio ativo da enzima. Esses achados reforçam o potencial desses derivados como candidatos promissores para investigações futuras, especialmente em abordagens terapêuticas voltadas a distúrbios associados à disfunção colinérgica.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- DUCASSE, M. et al. New insights into the pharmacological role of the peripheral anionic site of acetylcholinesterase: implications for Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 210–220, 2013.
- KIM, D. H. et al. Coumarin derivatives as multifunctional agents for Alzheimer's disease: a review. **Bioorganic Chemistry**, v. 99, p. 103847, 2020.
- LUQUE, F. J.; MUÑOZ-TORRERO, D. Acetylcholinesterase: A versatile template to coin potent modulators of multiple therapeutic targets. **Accounts of chemical research**, 2024.
- NOGUEIRA, C. W.; BARBOSA, N. V.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. **Archives of toxicology**, v. 95, n. 4, p. 1179–1226, 2021.
- PINTO, J. T. et al. Organoselenium compounds as cholinesterase inhibitors and antioxidant agents: potential applications in neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 145, p. 105011, 2021.
- PERIN, G. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of new coumarin-based compounds as potential acetylcholinesterase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 240, p. 114548, 2022.
- LLANES, L. C. et al. Anticholinesterase agents for Alzheimer's disease treatment: An updated overview. **Current medicinal chemistry**, v. 30, n. 6, p. 701–724, 2023.