

IN SILICO COMO FERRAMENTA DO DRUG DESIGN: UM ESTUDO COM ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DOENÇA DE ALZHEIMER COM HETEROCICLOS

MELINDA GOMES VICTOR¹; WILSON CUNICO²

¹Universidade Federal de Pelotas – melindagv@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – wjcunico@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurodegenerativa progressiva, prevalente principalmente em indivíduos acima dos 65 anos, sendo a principal causa de demência no mundo. Clinicamente, manifesta-se por deterioração da memória, linguagem e funções cognitivas superiores. É caracterizada pela deposição de β -amiloide (β A) e emaranhados de proteína tau (τ) hiperfosforilada, afetando especialmente neurônios colinérgicos do pró-encéfalo basal e prejudicando a transmissão colinérgica em regiões-chave, tais como hipocampo e córtex cerebral (HEBDA et al., 2016).

Diversos mecanismos patofisiológicos da DA vêm sendo explorados como alvos terapêuticos. Entre eles, os inibidores das colinesterases (ChEs), como a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), permanecem como pilares centrais na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos nas últimas décadas. A AChE é responsável pela hidrólise de cerca de 80% da acetilcolina (ACh), enquanto a BChE atua na degradação restante, estando também associada à intensificação da deposição de β A em estágios mais avançados da doença (HEBDA et al., 2016; FRONZA, 2023).

Evidências crescentes indicam que estratégias baseadas em substâncias multialvo (*multi-target*) são mais promissoras para lidar com a complexidade da DA, atuando simultaneamente sobre diferentes vias patológicas. Compostos com ação combinada sobre múltiplas enzimas-chave vêm demonstrando potencial neuroprotetor ampliado (FRONZA, 2023; MISHRA e SETHI, 2024; EDDAHMI et al., 2023). Nesse contexto, moléculas como a ladostigil, derivada da rasagilina, destacam-se como fármacos chamados promíscuos ou multimodais, por apresentarem ação combinada em múltiplos mecanismos patológicos. Heterociclos nitrogenados e sulfurados têm se mostrado promissores como inibidores multimodais, com efeitos colinérgicos e neuroprotetores (YOU DIM, 2013; HEBDA et al., 2016; MISHRA e SETHI, 2024; FRONZA, 2023; EDDAHMI et al., 2023).

Os compostos multimodais, frequentemente chamados de “fármacos promíscuos”, oferecem vantagens em relação aos ligantes seletivos, incluindo maior eficácia clínica, menor risco de efeitos adversos associados à polifarmácia e melhor adesão terapêutica, já que uma única molécula pode modular diferentes alvos implicados na progressão da DA (HEBDA et al., 2016).

Como etapa essencial no desenvolvimento racional de candidatos a fármacos, os estudos *in silico* permitem prever a afinidade de ligação de compostos bioativos com seus alvos moleculares por meio de simulações computacionais. O *docking* molecular, em particular, é amplamente utilizado através de ferramentas como AutoDock4 (AD4), AutoDock (AD) Vina, Maestro/Glide e GOLD. O AD Vina tem se destacado por sua maior eficiência computacional, sendo até cem vezes mais rápido que o AD4, com função de pontuação otimizada e suporte a execução paralela em múltiplos núcleos de CPU. Ainda assim, a escolha da ferramenta deve

considerar o sistema estudado, já que o AD4 pode oferecer melhor desempenho em casos específicos (TROTT e OLSON, 2010; NGUYEN et al., 2020).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo aplicar um protocolo automatizado de *docking* molecular, utilizando o AD Vina, para investigar o potencial de ligação de heterociclos contendo enxofre e nitrogênio à enzimas envolvidas na fisiopatologia da DA, contribuindo para a triagem e elucidação do mecanismo de ação de candidatos promissores ao desenvolvimento farmacológico.

2. METODOLOGIA

Para a avaliação da interação entre 32 heterociclos bioativos e 15 ligantes inibidores ou fármacos nas enzimas-alvo relacionadas à DA, foi realizado um protocolo de *docking* molecular automatizado utilizando o software AD Vina. Este conta com suporte de um script em Python desenvolvido com base na documentação oficial.

Ligantes: As estruturas foram desenhadas no ChemDraw e convertidas para os formatos .sdf ou SMILES, seguidas de otimização com minimização energética no Avogadro e exportação em .pdb.

Receptores: Modelos tridimensionais das enzimas foram obtidos do *Protein Data Bank* (PDB), com ligantes co-cristalizados descritos na Tabela 1. Após, houve a preparação no UCSF Chimera (remoção de ligantes, íons e água). As conversões para o formato .pdbqt foram feitas com os scripts do AutoDock Tools (ADT), com adição de hidrogênios polares e correção de cargas.

Tabela 1. Códigos PDB, nome das enzimas e seus ligantes co-cristalizados.

PDB	Enzima	Ligante	PDB	Enzima	Ligante
2ha2	mAChE	Succinilcolina	6ex1	hCAI	N19*
4ey5	hAChE	Huperzina A	5aml	hCAII	51J*
4bds	hBChE	Tacrina	6hk3	hGSK-3 β	C44 (ou G8B*)
3veu	hBACE1	NVP-AVI326 (ou 0GO*)	6y3c	hCOX-1	Celecoxibe ^a
2z5x	hMAO-A	Harmina	5kir	hCOX-2	Rofecoxib
2v5z	hMAO-B	Safinamida	5x61	AgAChE1	Donepezil ^a

^a Alinhada com ligante adicionado da enzima ortóloga. *Inibidor não aprovado clinicamente.

Docagem: Os parâmetros utilizados incluíram caixa de busca 30x30x30 Å, 10 modos, *exhaustiveness* 32. As coordenadas da grid foram baseadas no ligante co-cristalizado. A pontuação obtida é baseada na afinidade de ligação estimada em kcal/mol.

Execução Automatizada: Incluiu preparo e limpeza dos receptores, geração dos ligantes em .pdbqt (com otimização estereoquímica), execução paralela do Vina e armazenamento dos resultados (.log e .pdbqt).

Análise: As melhores poses (menor energia) foram inspecionadas visualmente no PyMOL, com identificação de interações moleculares. As afinidades foram organizadas em planilhas .csv, e gráficos/tabelas comparativas foram produzidos com o GraphPad Prism.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do *docking* molecular com o AD Vina encontra-se resumido na Figura 1. Como critério de classificação de afinidade (em kcal/mol), foram estabelecidas as seguintes faixas: alta ($\Delta G \leq -10$), boa ($-10 < \Delta G \leq -8$), moderada

($-8 < \Delta G \leq -6$) e fraca ($\Delta G > -6$). No geral, observou-se que a maioria dos compostos apresentou boa afinidade com as colinesterases, seguidas por MAO-B, CAI/CAII, BACE1 e GSK-3 β . Em contraste, foram pouco ativos frente à MAO-A e às COX-1/COX-2.

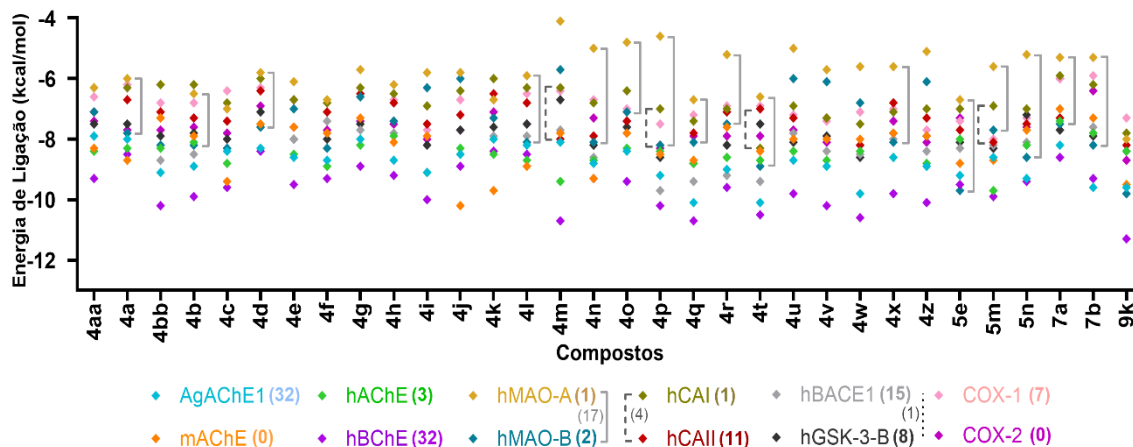


Figura 1. Perfil de afinidade molecular de compostos em múltiplas enzimas.

Iniciando pelas ChEs, donepezila ($\Delta G \approx -9,2$ kcal/mol) para hAChE e rivastigmina ($\Delta G \approx -6,9$ kcal/mol) para hBChE foram utilizadas como padrões comparativos. Todos os 32 compostos testados apresentaram melhor afinidade para hBChE que a rivastigmina, e três compostos (**5m**, **4m** e **4i**) mostraram-se mais ou igualmente potentes que a donepezila frente à hAChE. No entanto, nenhum composto foi mais ativo que a donepezila frente à mAChE (de *mus musculus*), o que pode sugerir limitações na translação pré-clínica dos resultados obtidos em modelos murinos. Por outro lado, frente à colinesterase de insetos (AgAChE1 de *Anopheles gambiae*), todos os 32 compostos superaram o ligante de referência EPE, indicando elevado potencial inibitório.

Para as monoaminoxidases (MAO-A e MAO-B), os compostos investigados mostraram maior afinidade para MAO-B, de relevância na Doença de Parkinson e outras demências. Apenas **9k** demonstrou afinidade relevante para MAO-A ($\Delta G = -8,0$), próxima à da moclobemida ($\Delta G = -8,1$), padrão seletivo para esta isoforma. E, conforme esperado, safinamida ($\Delta G = -9,3$) teve alta afinidade para MAO-B, assim como **5e** e **9k**, que também se mostraram seletivos. Logo, ao todo, 17 compostos demonstraram seletividade para MAO-B em relação à MAO-A.

Em relação às Anidrases Carbônicas (CA), apenas **4t** apresentou afinidade superior ao padrão para CAI, sendo o único seletivo para essa isoforma. Para CAII, 11 compostos mostraram afinidade superior, sendo **4m**, **4p** e **5m** os mais seletivos.

Quanto à hBACE1, enzima envolvida na formação de βA , 15 compostos superaram o ligante co-cristalizado inibidor (NVP-AVI326, $\Delta G = -8,3$ kcal/mol). Já para hGSK-3 β , envolvida na fosforilação anormal da proteína tau, 8 compostos mostraram afinidade superior ao padrão (G8Bc, $\Delta G = -8,3$ kcal/mol).

As COX-1/COX-2 foram incluídas pelo seu envolvimento na neuroinflamação, embora não diretamente ligadas a DA. Nenhum composto superou o padrão seletivo para COX-2 (celecoxibe, $\Delta G = -10,1$ kcal/mol). Porém, 7 compostos apresentaram melhor afinidade que o celecoxibe para COX-1 ($\Delta G = -8,0$ kcal/mol). Apenas **9k** demonstrou seletividade clara para COX-2, com diferença > 1 kcal/mol em relação à COX-1.

Os compostos com perfil multialvo promissor foram aqueles com afinidade alta ($\Delta G \leq -10$) para ao menos dois alvos ou boa afinidade em múltiplas enzimas-chave.

São eles: **4t**, **4q**, **4j**, **4v**, **4w**, **4p** e **5n**, sendo candidatos particularmente relevantes em abordagens *multitarget* para doenças neurodegenerativas. Espera-se compostos que atuem similar ao Ladostigil, que observou pela afinidade obtida a sua atuação condizente em AChE/BChE e MAO-A/B.

Alguns outros compostos como **9k**, **5e**, **7b** e **4z** também apresentaram perfis seletivos relevantes para enzimas específicas, como MAO-B, BChE e CAII. Esses resultados reforçam o potencial dos compostos organossulfurados estudados como *scaffolds* para desenvolvimento de fármacos com ação *multitarget*, especialmente no contexto de doenças como o Alzheimer e o Parkinson.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo são promissores e indicam o potencial dos compostos investigados como candidatos multialvo para o tratamento da DA. A metodologia computacional empregada mostrou-se eficaz, embora passível de aprimoramentos mínimos. Destacou-se entre os resultados a afinidade dos ligantes, especialmente com a BChE, que está mais ativa nos estágios mais avançados da doença. Futuramente, está prevista a síntese dos compostos mais promissores e a realização de ensaios *in vitro*, seguidos por testes *in vivo* em modelos roedores para validação terapêutica em contexto biológico mais complexo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EDDAHMI, Mohammed et al. Towards Alzheimer's disease-related targets: One-pot Cu(I)-mediated synthesis of new nitroindazolyltriazoles. **Bioorganic Chemistry**, s. l., v. 130, p. 106261, 2023.

FRONZA, Mariana G. The neurobiology and therapeutic potential of multi-targeting β -secretase, glycogen synthase kinase 3 β and acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. **Current Neuropharmacology**, s. l., v. 21, n. 3, p. 245–261, 2023.

HEBDA, Michalina et al. Synthesis, molecular modelling and biological evaluation of novel heterodimeric, multiple ligands targeting cholinesterases and amyloid beta. **Molecules**, s. l., v. 21, n. 3, p. 1–18, 2016.

MISHRA, K. M. Abha; SETHI, Kalyan K. Unveiling tomorrow: Carbonic anhydrase activators and inhibitors pioneering new frontiers in Alzheimer's disease. **Archiv der Pharmazie**, s. l., v. 357, n. 10, p. e24000748, 2024.

NGUYEN, Nguyen Thanh et al. Autodock Vina adopts more accurate binding poses but Autodock4 forms better binding affinity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, s. l., v. 60, p. 204–211, 2020.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, s. l., v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

YOUDIM, Moussa B. H. Multi-target neuroprotective and neurorestorative anti-Parkinson and anti-Alzheimer drugs ladostigil and M30 derived from rasagiline. **Experimental Neurobiology**, s. l., v. 22, n. 1, p. 1–10, 2013.