



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2025**

Identificação de potenciais candidatos a fármacos anti-Alzheimer com afinidade frente às colinesterases e Glicogênio Sintase Quinase 3 β humana

Willian Thiago Peixoto Pinto¹; Franco Henrique Andrade Leite²

1. Willian Thiago Peixoto Pinto, PIBIC/FAPESB, FARMACIA, e-mail: willianthiagopp@gmail.com

2. Franco Henrique Andrade Leite, DEPARTAMENTO DE SAÚDE, e-mail: fhenrique@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Alzheimer, inibidores triplos, triagem virtual.

INTRODUÇÃO

Doença de Alzheimer (DA) é uma alteração neurodegenerativa progressiva e irreversível, caracterizada por distúrbios cognitivos e perda de memória. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que mais de 55 milhões de pessoas vivam com a doença e esse número tende a triplicar até 2050. Dentre as alterações fisiopatológicas observadas no Sistema Nervoso Central (SNC) de pacientes com DA, destaca-se a deposição de placas de proteínas β -amilóide e disfunção do sistema colinérgico, que resulta na morte de neurônios e na perda da sinalização neuronal (De Souza; Carvalho; Rego, 2022; Da Costa et al., 2019).

Apesar da relevância em termos de saúde pública, o tratamento consiste na utilização de fármacos que agem apenas nos sintomas com objetivo de melhorar a cognição, mas sem a interrupção da progressão fisiopatológica da doença, tais como, inibidores da acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8), donepezil, galantamina e rivastigmina e antagonista do receptor NMDA (memantina) (Souza; Schilling, 2023; Da Costa et al., 2019).

Com o intuito de modificar a progressão da doença, outros dois fármacos/produtos biológicos estão disponíveis comercialmente em alguns países, o lecanemab em 2023 e o donanemab em 2024 (Febrax, 2024), porém com eficácia limitada e perfil de efeitos adversos graves. Por esse motivo, a busca por novos fármacos é crucial para aumentar a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença.

Uma forma de alcançar esse objetivo é a através de técnicas *in silico*, que permitem identificar compostos bioativos com potencial terapêutico frente a múltiplos alvos validados como a acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e a glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β , EC 2.7.11.26) (Barbosa, 2021; Da Costa et al., 2019). Nesse contexto, observa-se um crescente interesse no desenvolvimento de ligantes direcionados a múltiplos alvos ou *Multiple Target Directed Ligands* (MTDLs), onde uma única molécula é capaz de reunir diferentes ações farmacológicas, com potencial sinérgico e menor incidência de efeitos adversos (De Simone et al., 2021; Barbosa, 2021).

Para tanto, serão utilizadas abordagens computacionais visando a identificação de requisitos estereo-eletrônicos (modelo farmacofórico) e de afinidade (acoplamento molecular) suficientes para atividade biológica frente às três enzimas. Para tal, será empregado uma triagem virtual hierárquica frente a biblioteca Biogenic 2023, com o intuito de priorizar candidatos multialvos para testes biológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Triagem virtual por modelos farmacofóricos

Foram construídos modelos farmacofóricos para inibidores alostéricos de GSK-3 β com o auxílio do módulo GALAHAD disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0 e posteriormente validados por métricas de enriquecimento (ROC-AUC). O melhor modelo farmacofórico foi empregado para filtrar moléculas presentes na biblioteca Biogenic 2023. Adicionalmente, modelo farmacofórico dual para inibidores de AChE e BuChE previamente validado (Mascarenhas, 2020) foi empregado para triagem das moléculas filtradas pelo modelo farmacofórico da GSK-3 β .

Aplicação dos filtros físico-químicos e toxicológicos e o acoplamento molecular

As moléculas remanescentes da triagem virtual hierárquica foram submetidas ao servidor pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>) para predição de ADME/tox. Sendo avaliadas por meio dos filtros físico-químicos, o de Veber e Lipinski, que permitem estimar o potencial de absorção oral e as propriedades farmacocinéticas dos compostos. Além disso, aplicou-se o teste toxicológico AMES, para prever potencial carcinogênico, e o filtro de permeabilidade à barreira hematoencefálica (BBB *permeability*).

Triagem virtual por acoplamento molecular

As estruturas cristalográficas da acetilcolinesterase (PDB ID: 4MOE), da butirilcolinesterase (PDB ID: 4BDS) e da glicogênio sintase quinase-3 β (PDB ID 1PYX) foram obtidas no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>).

A preparação das estruturas foi realizada através da remoção de moléculas de água e artefatos, além da adição de átomos de hidrogênio para otimização das interações de hidrogênio com o auxílio do programa PyMOL. A protonação das enzimas foi ajustada para pH fisiológico entre 7,0 a 7,4 por meio do servidor PropKa.

Na etapa de acoplamento molecular, utilizou-se o software AutoDock Vina 1.1.2, aplicando os protocolos descritos por Mascarenhas et al. (2020) para AChE e BuChE, e Silva (2023) para GSK-3 β , para a seleção do *virtual hit*. Os mapas de interações foram gerados pelo programa Proteins Plus (<https://proteins.plus/>).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Triagem virtual por modelo farmacofórico

O melhor modelo farmacofórico para inibidores alostéricos de GSK-3 β apresentou excelente desempenho preditivo (AUC=0,99), demonstrando alta capacidade discriminatória entre moléculas ativas e falso-positivas. O modelo farmacofórico é composto por dois doadores de ligação de hidrogênio (magenta), três aceitadores de ligação de hidrogênio (verde) e dois centros hidrofóbicos (ciano), que refletem características essenciais para o reconhecimento molecular na cavidade alostérica da GSK-3 β (Figura 1).

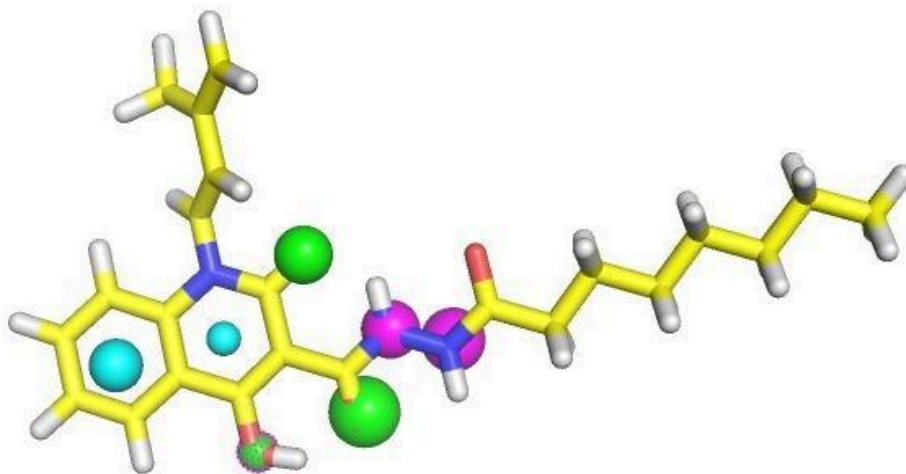


Figura 1- Representação do modelo farmacofórico para inibidores alostéricos da GSK-3 β .

A aplicação deste modelo farmacofórico no banco virtual da Biogenic 2023 ($n=76.536$), resultou na seleção de 351 moléculas com elevado grau de sobreposição (QFIT $>63,78$), indicando a presença da maioria dos requisitos estruturais. Após a triagem subsequente nos modelos farmacofóricos dual AChE e BuChE (Mascarenhas, 2020), 30 moléculas mantiveram sobreposição satisfatória com ambos os modelos farmacofóricos, sendo, portanto, selecionadas para a etapa de aplicação dos filtros físico-químicos e toxicológicos.

Aplicação dos filtros físico-químicos e toxicológicos

Entre as 30 moléculas priorizadas, seis atenderam aos critérios estabelecidos de ADME/Tox, apresentando menos de duas penalidades para os parâmetros desejáveis: peso molecular < 500 g/mol, cLogP < 5 , número de doadores de hidrogênio < 5 , aceptores de hidrogênio < 10 , ligações rotacionáveis < 10 e área de superfície polar < 140 Å². Além disso, toxicidade AMES negativa e permeabilidade à barreira hematoencefálica (log BB) entre -0,1 e 0,3. Sendo, portanto, selecionadas para a etapa de acoplamento molecular, a fim de calcular a afinidade e hipotetizar o modo de ligação.

Acoplamento molecular e resultado das interações proteína-ligante

O acoplamento molecular foi realizado considerando o sítio alostérico da GSK-3 β na cavidade sete (Palomo et al., 2011) e nos sítios ortostéricos das enzimas AChE e BuChE, a fim de avaliar o potencial de interação das moléculas selecionadas com as três enzimas- alvo. Dos valores obtidos do acoplamento molecular, utilizou-se como ponte de corte a exclusão de moléculas com valores maiores que -7,0 Kcal/mol. Portanto, as moléculas submetidas ao acoplamento molecular apresentaram os seguintes valores de energia para AChE, BuChE, GSK-3 β : ZINC000015120680 (-9,2; -8,5 e -7,4 kcal/mol, respectivamente); ZINC000004199939 (-9,2; -9,2 e -7,0, kcal/mol, respectivamente); ZINC000085593562 (-9,0; -8,5 e -8,3, kcal/mol, respectivamente).

Para essas três moléculas remanescentes, foram analisados os valores de somatório de sobreposição aos modelos farmacofóricos (dual + GSK-3 β). Os resultados de QFIT foram: ZINC000015120680 = 71,41, ZINC000004199939 = 73,23 e ZINC000085593562 = 76,44. ZINC000085593562 foi selecionada por apresentar o maior valor de sobreposição aos modelos e energia de afinidade acima do ponto de

corte. Em seguida, foram gerados os mapas de interações proteína-ligante para essa estrutura (Figura 2).

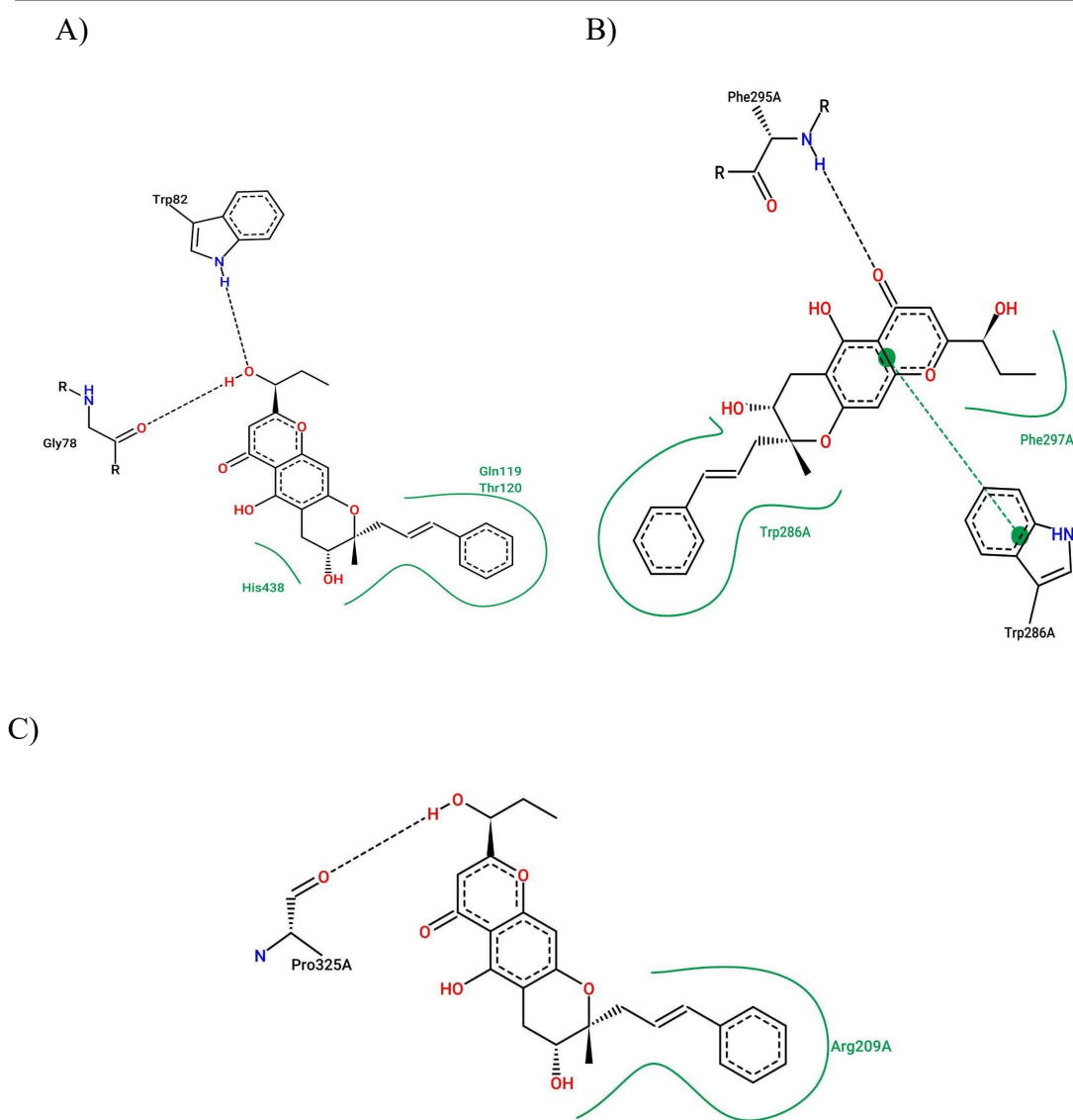


Figura 2- A) Representação das interações entre a BuChE e o ZINC000085593562. A interação com o resíduo Trp82 mostrou-se essencial para o reconhecimento e inibição da enzima (Barbosa, 2021). Além disso, foram observadas outras interações complementares, que contribuem para estabilizar o complexo proteína- ligante e reforçar o potencial inibitório da molécula. B) Representação das interações entre a AChE e o ZINC000085593562. As interações com os resíduos Trp286, Phe295 e Phe 297 mostraram-se essenciais para o reconhecimento e inibição da enzima (Barbosa, 2021). C- Representação das interações entre a GSK-3 β e o ZINC000085593562. A interação com o resíduo Arg209 mostrou-se essencial para o reconhecimento e inibição da enzima (Silva, 2023). Além disso, foi observado a interação complementar com o resíduo Pro325, estabilizando o complexo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas empregadas mostraram-se promissoras na identificação de moléculas com potencial multialvos para o tratamento de pacientes com DA. Os resultados indicam

afinidade relevante pelas enzimas estudadas. Ensaios *in vitro* e *in vivo* são necessários para corroborar os resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, Deyse Brito. Identificação de novos inibidores triplos frente a acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e beta secretase 1 humana. 2021. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2021.

DA COSTA, Daniel Castro et al. Compostos bioativos e seus alvos terapêuticos com propriedade Anti-Alzheimer: Uma revisão da literatura. Revista Arquivos Científicos (IMMES), Amapá, v.2, n.2, p.133-156, nov. 2019.

DE SIMONE, Angela et al. Glycogen Synthase Kinase 3 β : A New Gold Rush in Anti-Alzheimer's Disease Multitarget Drug Discovery?. Journal of Medicinal Chemistry, v.14, n.64, p.26-41, dez. 2021.

DE SOUZA, Maria Eduarda Dos Reis; CARVALHO, Rafael Leite; REGO, Livia Soledade de Moraes. Aspectos genéticos da Doença de Alzheimer e seus novos avanços. Revista Ciências Biológicas, São Paulo, 2022.

FEBRAZ- Federação Brasileira das Associações de Alzheimer. Donanemab: “Embora não cure a doença, atrasa o declínio cognitivo entre 4 e meses”, São Paulo, 25 jul. 2024.

MASCARENHAS, A. M. S.; ALMEIDA, R. B. M.; ARAUJO NETO, M. F.; MENDES, G. O.; CRUZ, J. N.; SANTOS, C. B. R.; BOTURA, M. B.; LEITE, F. H. A. Pharmacophore-based virtual screening and molecular docking to identify promising dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020.

PALOMO, V. et al. Exploring the binding sites of glycogen synthase kinase 3. identification and characterization of allosteric modulation cavities. Journal of Medicinal Chemistry, v. 54, n. 24, p. 8461–8470, 2011.

SILVA, Guilherme Martins da. Planejamento computacional e avaliação biológica de inibidores alostéricos de glicogênio sintase cinase 3 β com interesse na doença de Alzheimer. 2023. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

SOUZA, João Pedro Ferrari; SCHILLING, Lucas Porcello. Towards a new era in Alzheimer's disease diagnosis and treatment. Pan American Journal of Aging Research, Porto Alegre, v. 11, p. 1-6, dez. 2023.

THE PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0, Schrödinger, LLC.

TRIPOS. SYBYL-X 2.0. Discovery Software for Computational Chemistry and Molecular Modelling, St. Louis: Tripos Inc, 2012.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry. v. 31, Issue 2, 2009, p. 455-461