

PLANEJAMENTO *IN SILICO* DE NOVOS INIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASE PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Autores:

Ana Júlia Rodrigues Lacerda¹, Matheus Paulo Bastos², Heberth de Paula¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, S/N – 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, anajulia.r09@gmail.com, heberth.paula@ufes.br.

²Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Computação, Alto Universitário, S/N – 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, mathpbastos@gmail.com.

Resumo

O artigo objetiva identificar candidatos inéditos para a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), através de estudos *in silico*, de maneira a contribuir para o desenvolvimento de fármacos voltados ao tratamento da Doença de Alzheimer. A metodologia empregou a seleção de uma estrutura cristalográfica da enzima; triagem virtual farmacofórica; análise de propriedades ADME/*BOILED-Egg*; *docking* molecular; seleção dos melhores candidatos (AJ20, AJ45, AJ59, AJ74 e AJ97); dinâmica molecular, complementada por cálculos de estabilidade enzimática, energia livre (ΔG) e mapas de ligação. Os resultados apontam uma ótima estabilidade enzimática dos complexos. AJ20 e AJ59 apresentaram menor afinidade por AChE (maiores ΔG), tendo o último desligado-se recorrentemente da enzima. Ligações de hidrogênio, empilhamento π e cátion- π foram as interações mais frequentes, com destaque para AJ45 como o mais interativo e de maior afinidade (menor ΔG), seguido de AJ74 e AJ97. Conclui-se que AJ45, AJ74 e AJ97 representam candidatos promissores a compostos-*lead* em futuros planejamentos de novos fármacos para o controle da progressão da Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Planejamento de fármacos. Virtual screening. Docking molecular. Dinâmica molecular.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde – Farmácia.

Introdução

Demência é utilizada como termo guarda-chuva para diferentes condições neurodegenerativas — e, em alguns casos, secundária a outras patologias —, caracterizadas pelo declínio crônico, progressivo e incurável de habilidades cognitivas, comprometendo a autonomia e a qualidade de vida. Entre as manifestações, destacam-se comprometimentos de linguagem e compreensão (afasia), de reconhecimento (agnosia) e de planejamento e execução motora (apraxia), além de distúrbios mentais, déficits de memória, instabilidade emocional e dificuldades de coordenação motora (Araújo; Nicoli, 2010; Najafi *et al.*, 2017; Rastegari *et al.*, 2019). A Doença de Alzheimer (DA) constitui a forma mais frequente de demência e responde por cerca de 70% dos 7,5 milhões de novos diagnósticos anuais no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (Rodrigues *et al.*, 2019).

A etiologia da DA é multifatorial. Hipóteses investigadas incluem predisposições genéticas, fatores de estilo de vida, acúmulo de β -amiloide, hiperfosforilação de Tau, estresse oxidativo e processos inflamatórios. Entre elas, a hipótese colinérgica, centrada na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), permanece uma das mais aceitas e estudadas para explicar a disfunção sináptica e o déficit cognitivo (Najafi *et al.*, 2017; Rastegari *et al.*, 2019). AChE é a principal enzima colinérgica em um cérebro saudável e apresenta alta seletividade pela acetilcolina (ACh), neurotransmissor-chave do sistema nervoso parassimpático (Ventura *et al.*, 2010; Araújo; Santos; Gonsalves, 2016). Essa hidrolase encontra-se nas regiões sinápticas dos sistemas nervosos central, autônomo e periférico, e em junções neuromusculares (Araújo; Santos; Gonsalves, 2016). Sua função é regular a liberação, a captação e a concentração de ACh por meio de hidrólise catalítica (Rastegari *et al.*, 2019).

Estruturalmente, AChE é um monômero elipsoide (Walczak-Nowicka; Herbet, 2021). Seu sítio ativo é uma cavidade estreita e profunda, rica em anéis aromáticos e resíduos de carga negativa, que promovem especificidade, reconhecimento, atração, alinhamento, condução e estabilização do neurotransmissor ao longo do canal catalítico. Essa cavidade subdivide-se em cinco regiões: cavidades acil e oxiânion e os subsítios aniônico, aniônico periférico e esterásico. Apenas o subsítio esterásico, composto pelos resíduos Ser203, His447 e Glu334, é responsável pela hidrólise de ACh (Walczak-Nowicka; Herbet, 2021; Dileep *et al.*, 2022).

A inibição de AChE interrompe temporariamente a catálise de ACh, eleva sua disponibilidade sináptica e favorece a neurotransmissão, retardando a progressão clínica da DA (Araújo; Santos; Gonsalves, 2016; Najafi *et al.*, 2017). Quatro inibidores de AChE (AChEI) são utilizados no tratamento sintomático: donepezila, galantamina e tacrina, de ação reversível, e rivastigmina, de ação pseudo-irreversível (Forlenza, 2005). Inibidores irreversíveis não são indicados, pois o bloqueio permanente da enzima pode causar intoxicação colinérgica, levando à degeneração de junções neuromusculares, convulsões, paralisia e fraqueza muscular — assim como ocorrido com inseticidas carbamatos e organofosforados (Harel *et al.*, 2008).

Diante desse panorama, este trabalho propõe a identificação e planejamento de novos inibidores de AChE como candidatos promissores para atenuar a progressão da DA.

Metodologia

O desenvolvimento dos estudos baseou-se inteiramente em métodos computacionais, utilizando-se protocolos de *virtual screening*, *docking* molecular e dinâmica molecular, selecionando e priorizando potenciais inibidores de AChE. As etapas foram conduzidas de maneira sequencial, permitindo uma avaliação integrada de estabilidade enzimática, afinidade e interações moleculares dos compostos candidatos.

1. Seleção estrutural: as estruturas cristalográficas de AChE foram triadas através de *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Aplicaram-se os critérios: (i) AChE em complexo apenas com fármacos de interesse (donepezila, galantamina, rivastigmina ou tacrina); (ii) origem biológica de AChE em *T. californica*, *M. musculus* e *H. sapiens*; (iii) conferência dos resíduos de seu sítio ativo; (iv) menor valor de resolução (Å); e (v) preferência pela origem humana.

2. Triagem virtual farmacofórica: a identificação dos candidatos foi realizada pelo servidor Pharmit (<https://pharmit.csb.pitt.edu/>), buscando compostos que reproduzissem os grupos farmacofóricos do inibidor de referência. Empregaram-se filtros: *Rotatable Bonds* ≤ 10 , *Polar Surface Area* $\leq 140 \text{ Å}^2$, *H-Bond Acceptors* ≤ 10 , *H-Bond Donors* ≤ 5 , LogP entre $-0,4$ e $+5,6$, e tolerância = 1.0 para *Inclusive* e *Exclusive Shape* (ligante e receptor), conforme Mahfuz *et al.* (2022). Ao final de cada busca aplicou-se *Max Score* = -13 kcal/mol .

3. Filtragem ADME: os compostos pré-selecionados foram adicionados ao servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) para a geração do diagrama *BOILED-Egg*, restando-se apenas moléculas com probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE).

4. *Docking* molecular: os candidatos aprovados foram submetidos ao *docking* pelo software GOLD (v. 2024.2) empregando a função de pontuação e configurações validadas no *redocking*, com *Search Efficiency* de 30% (modo *Virtual Screening*) e *rescore* ChemScore. Para cada composto geraram-se 100 poses (*GA Runs*), das quais apenas as cinco melhores conformações seguiram adiante segundo a energia livre estimada (ΔG) e consistência de interações no sítio ativo.

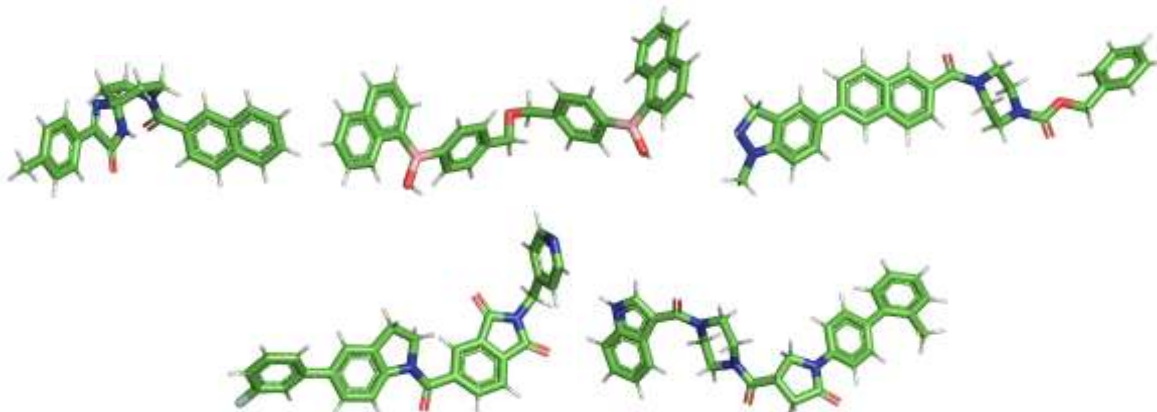
5. Dinâmica molecular: as cinco melhores moléculas foram estudadas por dinâmica molecular através do GROMACS (v. 2025.2). A estabilidade dos complexos (RMSD/RMSF), seus perfis de interação e energias de ligação foram determinados via gmx_MMPBSA, contemplando componentes eletrostáticos, de Van der Waals e de solvatação (MMPBSA). A inspeção visual e a análise de suas interações foram conduzidas via PyMOL.

6. Critérios para decisão: foram consideradas prioridade: (i) manutenção de contatos no subsítio esterásico e periférico compatíveis com o padrão do inibidor de referência; (ii) ΔG mais favorável no *docking* e na MMPBSA; (iii) estabilidade estrutural ao longo da DM (RMSD/RMSF) e integridade das ligações; e (iv) perfil ADME compatível com penetração no sistema nervoso central.

Resultados

A estrutura 6O4W (AChE humana em complexo com donepezila) foi selecionada por atender aos critérios metodológicos. O mapeamento farmacofórico da donepezila identificou anéis aromáticos, aceptores/doadores de hidrogênio e interações hidrofóbicas que guiaram a triagem. Aplicando-se um *Max Score* = -13 kcal/mol foram obtidos 650 candidatos, sendo retidos pelo diagrama *BOILED-Egg* 100 compostos com probabilidade de atravessar a BHE. Com GoldScore (5 Å) e *rescore* ChemScore, geraram-se 100 poses por ligante. As cinco melhores conformações por composto foram avaliadas, emergindo como prioritários AJ20, AJ45, AJ59, AJ74 e AJ97 (Fig. 1A–1E).

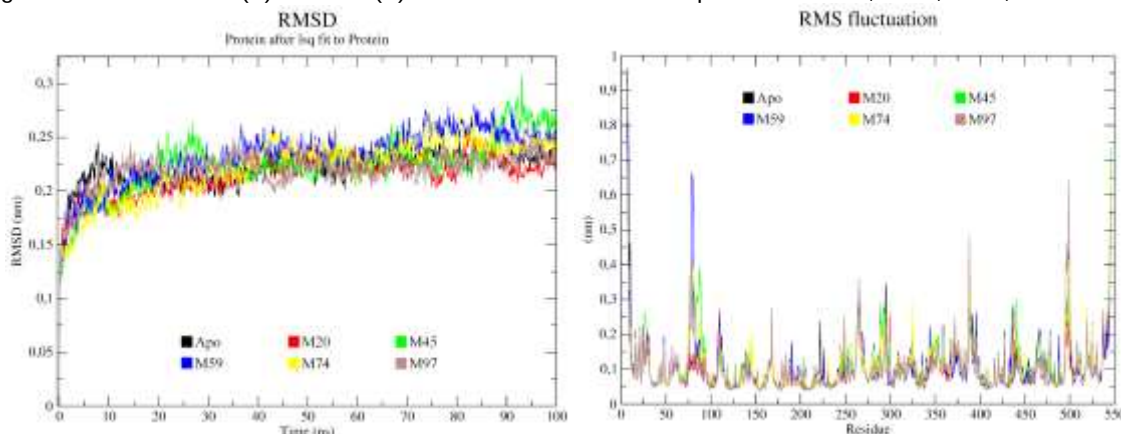
Figura 1 – Estrutura 3D dos compostos AJ20 (A), AJ45 (B), AJ59 (C), AJ74 (D) e AJ97 (E), respectivamente.



Fonte: elaborado pelos próprios autores (2025).

Utilizando AChE inativa (Apo AChE) como referência, foram calculados o Desvio Quadrático Médio (RMSD) e Flutuação Quadrática Média (RMSF) dos cinco complexos de AChE. Todos apresentaram uma ótima estabilidade enzimática, assemelhando-se aos valores de referência. Os picos observados em RMSF referem-se a resíduos de alça altamente flexíveis — um resultado esperado. Somente um pico visualizado em Glu87 nos resultados de AJ45, uma estrutura α -hélice, pode ser justificado por uma atração momentânea pelo composto (Fig. 2A e 2B).

Figura 2 – Perfis RMSD (A) e RMSF (B) de AChE inibida e em complexo com AJ20, AJ45, AJ59, AJ74 e AJ97.



Fonte: elaborado pelos próprios autores (2025).

As estimativas ΔG (gmx_MMPBSA) indicaram maior afinidade para AJ45, AJ74 e AJ97 (valores mais negativos). AJ20 apresentou o segundo maior ΔG apesar de sua boa estabilidade estrutural, reduzindo sua prioridade. AJ59 demonstrou a menor afinidade devido ao seu elevado ΔG (Tab. 1).

Tabela 1 – Média de energia livre estimada (ΔG) e erros padrões de cada um dos compostos.

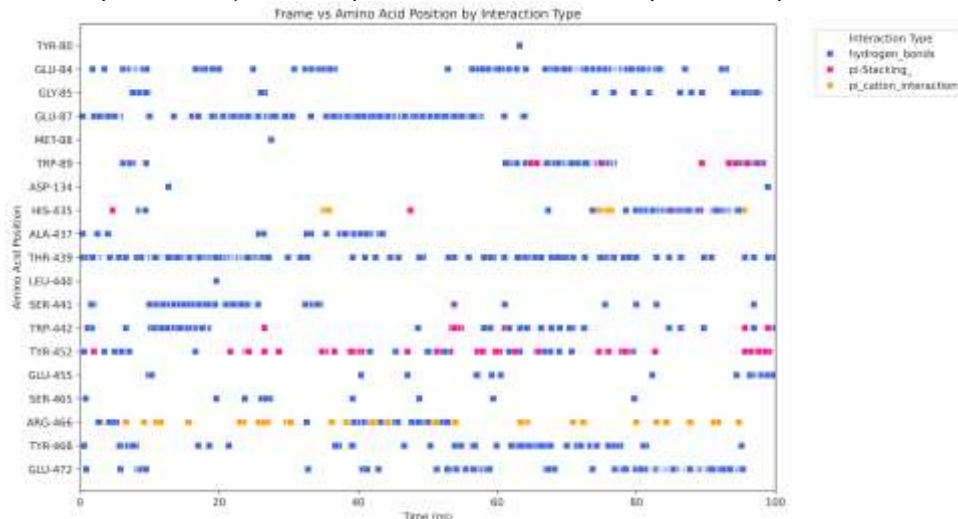
Energia livre	AJ20	AJ45	AJ59	AJ74	AJ97
Média (kcal/mol)	-16,80 $\pm$ 0,57	-26,39 $\pm$ 0,85	-12,17 $\pm$ 0,96	-23,27 $\pm$ 0,75	-22,47 $\pm$ 0,65

Fonte: elaborado pelos próprios autores (2025).

Seus mapas de interações (100 ns) destacaram predominância de ligações de hidrogênio, cátion- π e empilhamento π . Resíduos Glu84, Glu87, Asp134, Ala437, Thr439, Ser441, Tyr452, Ser465, Arg466 e Asn467 contribuíram mais frequentemente, com recorrência de Thr439, Ser441, Tyr452, Arg466 e Asn467 na maioria dos complexos. Devido à presença de flúor, AJ74 exibiu interações de halogênio

com His435, Gly447, Pro449 e Glu472 associadas à uma maior afinidade e baixo ΔG . AJ59 formou pontes salinas ocasionais com Glu87. AJ45 destaca-se por manter interações frequentes e persistentes com Arg466, Tyr452, Thr439 e Glu87 (Fig. 3).

Figura 3 – Mapa de interação do composto AJ45, destacando-se pela maior quantidade de interações.



Fonte: elaborado pelos próprios autores (2025).

O protocolo baseado em 6O4W/GoldScore (5 Å) foi validado: a cascata VS → ADME/BHE → docking → DM/MMPBSA priorizou AJ45, AJ74 e AJ97 como candidatos com melhor balanço entre afinidade (ΔG), estabilidade conformacional e interações-chave no sítio catalítico/periférico, enquanto AJ20 e AJ59 mostraram limitações energéticas.

Discussão

O profundo e multifacetado sítio ativo de AChE envolve 22 resíduos distribuídos entre seu subsítio aniônico (Trp86, Tyr133, Glu202, Tyr337, Gly448, Ile451), aniônico periférico (Tyr72, Asp74, Tyr124, Ser125, Trp286, Tyr341), suas cavidades acil e oxiânion (Trp236, Phe295, Phe297, Phe338 e Gly121, Gly122, Ala204) e seu subsítio esterásico (Ser203, His447, Glu334) (Walczak-Nowicka; Herbet, 2021; Dileep *et al.*, 2022). Nos complexos analisados, as interações predominam nas vizinhanças da garganta catalítica — notadamente Tyr72, Asp74, Trp86, Tyr133, Gly448 e Ile451 — com contatos ocasionais de Trp286 (AJ59) e His447 (AJ74). Esse padrão sustenta um mecanismo de inibição por bloqueio estérico, limitando o acesso de ACh e sua condução ao subsítio esterásico. Os perfis RMSF concentram picos em alças (*loops*): estruturas maleáveis que modulam a acessibilidade e proteção do sítio ativo (Nestl; Hauer, 2014). Sendo assim, variações em Pro109, Arg168, Gly264, Glu295, Asp387 e Lys499 no estado Apo são esperadas (Almeida; Paula; Paneto, 2024).

O pico excepcional em Glu87 (α -hélice) no perfil RMSF de AJ45 pode ser explicado por ligações de hidrogênio persistentes entre esse resíduo e a porção naftalênica do ligante até ~600 ns, seguidas de relaxamento e afastamento visualizados no PyMOL. Para AJ59, picos em Thr78 e Tyr80 indicam afinidade emergente em ~630 ns devido a ligações de hidrogênio, empilhamento π e cátion- π , com Leu79 acompanhando por efeito de vizinhança. Sua trajetória mostra, todavia, desligamento completo em ~300 ns, seguida de reassociação entre ~470–590 ns e um novo desprendimento até ~630 ns, quando se estabilizam as interações com Thr78 e Tyr80. Esta “recuperação” momentânea ocorre em região superficial rica em alças, via ligações de hidrogênio com Asn353, Glu354, Ala437, Ser438, Leu444, Trp445, Arg466 e Asn467, contatos cátion- π com Arg436 e empilhamento π com Tyr452, caracterizando uma associação majoritariamente superficial e baixa persistência no canal catalítico.

Termodinamicamente, valores de ΔG mais negativos refletem uma maior espontaneidade de ligação (Jiménez; Benítez, 2021). AJ59 exibiu ΔG menos favorável ($-12,17 \pm 0,96$), coerente com suas dissociações recorrentes, enquanto AJ20, apesar de oferecer uma ótima estabilização da conformação global/local, apresentou o segundo maior ΔG , limitando sua priorização. Em contraste, AJ45 mostrou

ΔG mais favorável ($-26,39 \pm 0,85$) e mapa de interações denso com Arg466, Tyr452, Thr439 e Glu87, aproximando-se do desempenho da donepezila ($\Delta G -27,73 \pm 4,03$) calculado por MMPBSA (Khan *et al.*, 2021), reconhecida a dependência metodológica.

Em síntese, a ocupação preferencial do sítio aniônico periférico e regiões contíguas, combinando contatos aromáticos/hidrofóbicos com ligações de hidrogênio e, quando presentes, interações cátion- π /halogênio, reduz o fluxo de ACh; redes de contato persistentes (AJ45) correlacionam-se com ΔG mais negativo e maior estabilidade (RMSD/RMSF), ao passo que associações transientes (AJ59) se traduzem em afinidade modesta. As inferências, baseadas em DM e MMPBSA, dependem de força de campo e amostragem; FEP/TI, DM com replicatas e ensaios enzimáticos *in-vitro* são recomendados. Priorizam-se AJ45 e, em seguida, AJ74/AJ97; AJ20 e AJ59 apresentam limitações.

Conclusão

Como uma doença multifatorial, torna-se um desafio o desenvolvimento de novos medicamentos capazes de interromper completamente, ou mesmo reverter, os sintomas da progressão da Doença de Alzheimer. Descrita como uma das principais causas de seu aparecimento, a inibição da atividade de AChE dá origem, entretanto, a diversos estudos com enfoque nesta enzima. Os compostos selecionados para este trabalho demonstraram ação bloqueadora do sítio ativo de AChE, impedindo a hidrólise de ACh. Embora todos os complexos propostos mantenham uma ótima estabilidade enzimática durante a simulação, AJ45 se destaca quanto ao seu baixo valor de ΔG e maior afinidade enzimática, vasta quantidade de interações e uma fixação estável no sítio ativo de AChE durante sua trajetória. AJ74 e AJ97 também se destacam como outras ótimas escolhas ao apresentarem valores de ΔG próximos ao de AJ45, além de manterem uma boa estabilidade e interações com AChE. AJ20, embora colabore para uma ótima estabilidade, apresenta valores de ΔG menos impressionantes. AJ59 demonstrou a menor afinidade pela enzima, uma vez que desligou-se completamente dela ao decorrer de sua trajetória. Os resultados demonstram que AJ74, AJ97 e principalmente AJ45 deveriam ser estudados mais detalhadamente como excelentes compostos-*lead* em planejamentos *in silico* de novos medicamentos para o tratamento da Doença de Alzheimer.

Referências

- ALMEIDA, R. L. F. de; PAULA, H. de.; PANETO, G. G. Análise das Interações do RBD-Spike da Variante Ômicron do SARS-CoV-2 com ACE2 por Dinâmica Molecular. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 28., 2024, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Univap, 2024. p. 1-6.
- ARAÚJO, C. L. de O.; NICOLI, J. S. Uma revisão bibliográfica das principais demências que acometem a população brasileira. **Revista Kairós-Gerontologia**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 231-244, 2010. DOI: 10.23925/2176-901X.2010v13i1p%25p. Disponível em: <https://revistas.pucsp.br/index.php/kairos/article/view/4872>. Acesso em: 17 ago. 2025.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. dos A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase – AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016. DOI: 10.21577/1984-6835.20160122. Disponível em: <https://rvq.sbq.org.br/pdf/v8n6a04>. Acesso em: 17 ago. 2025.
- DILEEP, K. V. *et al.* Crystal structure of human acetylcholinesterase in complex with tacrine: Implications for drug discovery. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 210, p. 172-181, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813022009643?via%3Dihub>. Acesso em: 17 ago. 2025.
- FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005. DOI: 10.1590/S0101-60832005000300006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpc/a/RtsYhwfHPBmSvpXgJHzdVWs/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2025.

HAREL, M. *et al.* Crystal Structure of Thioflavin T Bound to the Peripheral Site of *Torpedo californica* Acetylcholinesterase Reveals How Thioflavin T Acts as a Sensitive Fluorescent Reporter of Ligand Binding to the Acylation Site. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 130, n. 25, p. 7856-7861, 2008. DOI: 10.1021/ja7109822. Disponível em: <https://pubs-acsc.org.ez43.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1021/ja7109822>. Acesso em: 17 ago. 2025.

JIMÉNEZ, J. S.; BENÍTEZ, M. J. Gibbs Free Energy and Enthalpy–Entropy Compensation in Protein–Ligand Interactions. **Biophysica**, v. 4, n. 2, p. 298-309, 2024. DOI: 10.3390/biophysica4020021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-4125/4/2/21>. Acesso em: 3 set. 2025.

KHAN, M. I. *et al.* Discovery of novel acetylcholinesterase inhibitors through integration of machine learning with genetic algorithm based *in silico* screening approaches. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 16, e1007389, 2023. DOI: 10.3389/fnins.2022.1007389. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2022.1007389/full>. Acesso em: 3 set. 2025.

NAJAFI, Z. *et al.* Novel tacrine-1,2,3-triazole hybrids: *In vitro*, *in vivo* biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 125, p. 1200-1212, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.11.008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523416309461?via%3Dihub>. Acesso em: 17 ago. 2025.

NESTL, B. M.; HAUER, B. Engineering of Flexible Loops in Enzymes. **ACS Catalysis**, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 3201-3211, 2014. DOI: 10.1021/cs500325p. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cs500325p>. Acesso em: 1 set. 2025.

RASTEGARI, A. *et al.* Design, synthesis and anti-Alzheimer's activity of novel 1,2,3-triazole-chromenone carboxamide derivatives. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 83, p. 391-401, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.10.065. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045206818302323?via%3Dihub>. Acesso em: 17 ago. 2025.

RODRIGUES, N. M. *et al.* Análise da patogênese da doença de Alzheimer: revisão narrativa da literatura. **HU Revista**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 465-470, 2019. DOI: 10.34019/1982-8047.2019.v45.27807. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/25924>. Acesso em: 17 ago. 2025.

VENTURA, A. L. M. *et al.* Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010. DOI: 10.1590/S0101-60832010000200007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpc/a/TZmvQnDBxM9nDw39QCJhpsf/?lang=pt>. Acesso em: 17 ago. 2025.

WALCZAK-NOWICKA, L. J.; HERBET, M. Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Diseases and the Role of Acetylcholinesterase in their Pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 17, e9290, 2021. DOI: 10.3390/ijms22179290. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/17/9290>. Acesso em: 17 ago. 2025.