



PRODUTOS NATURAIS COMO PROMISSORES INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE: UM ESTUDO IN SILICO

Natural products as promising acetylcholinesterase inhibitors: in silico study

Felipe Vitória¹, Gleyton Leonel Silva Sousa¹, José Aleixo de Azevedo-França²

¹ *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.*

² *Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.*

*Autor para Correspondência: vitorioch@gmail.com

RESUMO

Um grupo de seis produtos naturais, usados como ponto de partida no estudo de novos derivados estruturais, foram analisados frente a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) *in silico* e previsão sobre o modelo de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação e Toxicidade (ADMET). Usando ferramentas de modelagem molecular para verificar as interações de 6-gingerol, 6-shogaol, curcumina, piperina, β -lapachona e lapachol, em comparação com a galantamina padrão com a enzima AChE. Os resultados mostraram que os compostos 6-gingerol e 6-shogaol apresentam as melhores interações *in silico* e as melhores propriedades ADMET com potencial terapêutico sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) comparados ao padrão galantamina (GNT), além de fazerem interações químicas *in silico* adicionais interessantes com o sítio ativo da enzima. Este trabalho traz resultados preliminares que são base para novos



estudos com variações estruturais nos compostos com melhores interações *in silico*.

Palavras-chave: Inibição Acetilcolinesterase; ADMET; Doença de Alzheimer; Química Medicinal.

ABSTRACT

A group of six natural products, used as a starting point in the study of new structural derivatives, were analyzed for acetylcholinesterase (AChE) inhibition *in silico* and Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, Toxicity (ADMET) prediction. Using docking modeling tools to verify the interactions of 6-gingerol, 6-shogaol, curcumin, piperine, β -lapachone and lapachol, compared to the standard galantamine with the acetylcholinesterase enzyme. The results showed that the compounds 6-gingerol and 6-shogaol interact the most *in silico* and they have the best ADMET properties with therapeutic potential on the Central Nervous System compared to the standard galatamine (GNT), besides making additional interesting *in silico* chemical interactions with the enzyme's active site. This work brings preliminary results that are the basis for further studies with structural variations in compounds with better interactions *in silico*.

Keywords: Acetylcholinesterase Inhibition; ADMET; Alzheimer's disease; Medicinal Chemistry.

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica que pode causar a perda gradual de memória e outras funções (LINDEBOOM & WEINSTEIN, 2004). Também é caracterizada pela diminuição da atividade neuronal colinérgica, deposição de agregados de proteínas anormais; inflamação



do nervo; disfunção da homeostase metálica e estresse oxidativo (CRAIG *et al.*, 2011; HOLMES *et al.*, 2011). A nível molecular, a hipótese colinérgica é a mais estudada teoria para explicar a fisiopatologia da DA, que é definida como um processo degenerativo sério que destruirá seletivamente os grupos de neurônios colinérgicos dentro do hipocampo e neocórtex, causado pela degeneração de neurônios colinérgicos dentro do núcleo basal do cérebro. As regiões do hipocampo e neocórtex desempenham importantes papéis funcionais na consciência, atenção, aprendizagem, memória e outros processos cognitivos (SANABRIA-CASTRO *et al.*, 2017). Como resultado da neurodegeneração, observou-se uma diminuição na atividade de neurônios colinérgicos. Com o desenvolvimento desta hipótese pode-se chegar então aos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), que podem restaurar a função colinérgica bloqueando a AChE, responsável pela acetilcolina (ACh) em sinapses nervosas (FERRI *et al.*, 2006).

Atualmente, o tratamento é baseado em controles sintomáticos, principalmente associados à utilização de inibidores de colinesterases. Como os resultados clínicos da maioria dos candidatos a medicamentos anti-Alzheimer não foram aprovados, a estratégia de utilização de compostos com múltiplos alvos tem um significado considerável neste campo. Uma das principais abordagens promissoras para o tratamento desta doença é reforçar o nível de acetilcolina dentro do cérebro usando inibidores de AChE (FISH *et al.*, 2019). Dentre os inúmeros inibidores em estudo atualmente se destacam os de origem sintética, e também os provenientes de fontes naturais (LEE *et al.*, 2019), os quais são alvo deste trabalho.

A natureza é uma rica fonte de diversidade biológica e química. As estruturas únicas e sofisticadas dos produtos naturais não podem ser obtidas facilmente por síntese orgânica, mas podem ser modificadas levando a novas entidades químicas. Uma variedade de plantas no mundo é usada como remédios



medicinais tradicionais (VIEGAS-JR *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 2021). Os produtos naturais são fontes potenciais de inibidores de AChE, como mostram vários estudos (LEE *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2018; DOS SANTOS *et al.*, 2018; MOODIE *et al.*, 2019). Estudos de revisão mostraram que cerca de 70% dos extratos de mais de 300 plantas e mais de 2500 substâncias isoladas de cerca de 90 famílias de plantas foram testados frente a colinesterases exibindo um efeito inibidor significativo sobre enzimas colinérgicas (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006; AHMED *et al.*, 2021). Alguns fármacos atualmente usados para tratar a DA, são inibidores de AChE, incluindo: galantamina, donepezila, tacrina, rivastigmina, sendo a galantamina um alcalóide natural isolado de *Galanthus spp.* Donepezila e tacrina foram sintetizados e aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos da América. A rivastigmina foi planejada a partir do alcalóide natural fisostigmina. Outro alcaloide natural, Huperzina A, é um inibidor de AChE, que pode ser usado em suplementos alimentares para auxiliar a memória (AHMED *et al.*, 2021).

O objetivo deste trabalho é verificar interações *in silico* dos produtos naturais 6-gingerol, 6-shagaol, curcumina, piperina, β -lapachona e lapachol, (a-f, respectivamente, Figura 1) em comparação com galantamina (**GNT**), que é um inibidor de AChE bem conhecido, e correlacioná-los com suas propriedades ADMET. A escolha destes compostos pelo grupo de pesquisa é fruto de resultados preliminares que estão servindo para guiar novos estudos *in silico*, com outros alvos moleculares de AChE, e também modificações estruturais dos compostos escolhidos na busca de inibidores ainda mais potentes.

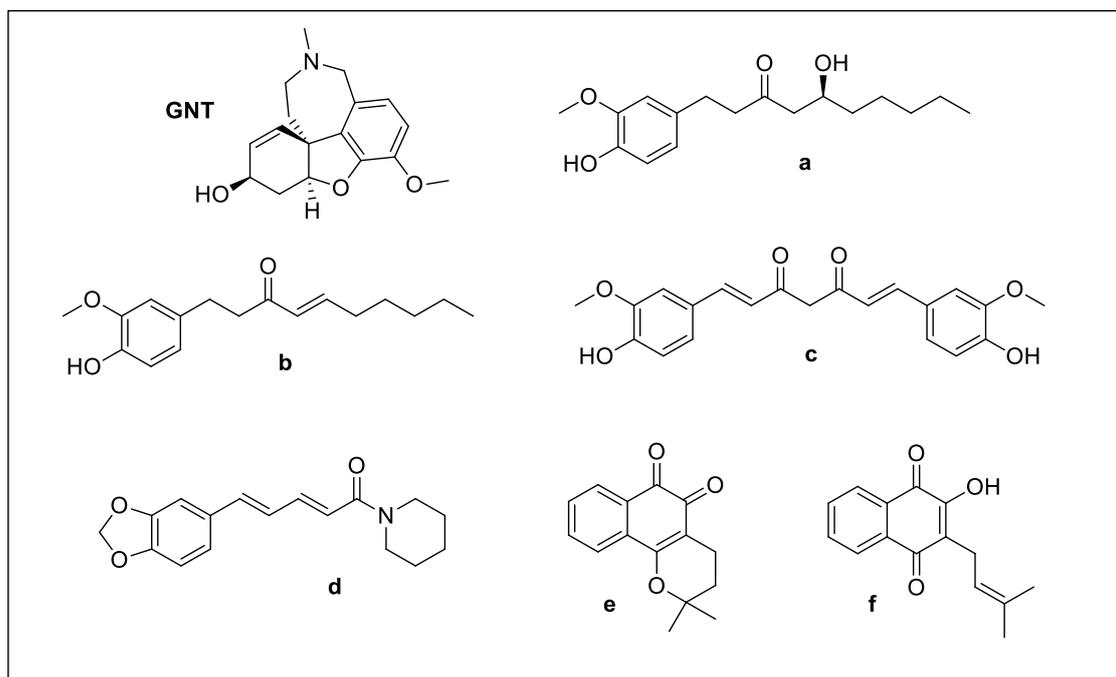


Figura 1 - Estruturas dos compostos Galantamina (**GNT**), e 6-gingerol, 6-shagaol, curcumina, piperina, β -lapachona e lapachol, (**a-f**, respectivamente).

METODOLOGIA

Um estudo de ancoragem molecular foi realizado com a enzima acetilcolinesterase humana recombinante (AChEhr) em complexo com a galantamina (código *PDB*: 4EY6). Foram implementados experimentos de *redocking* como um teste preliminar a avaliar a capacidade do programa de ancoramento molecular *GOLD 5.6* (*CCDC Software Ltd., Cambridge, UK*) para encontrar soluções confiáveis para o *docking* da colinesterase em questão. Átomos de hidrogênio foram adicionados a estruturas de proteínas baseadas na ionização e estados tautoméricos definidos pelo programa *GOLD 5.6*. Durante o procedimento de busca, foram utilizadas 100 operações genéticas (*crossover*, migração, mutação) para cada ancoramento. O raio de locais de ligação para as enzimas foi de 10Å. Todas as quatro funções de pontuação disponíveis no



programa foram capazes de reproduzir a postura de ancoramento quando da galantamina com a enzima no ensaio de *redocking*, e os valores de *RMSD* foram inferiores a 1,00 Å. *ChemPLP* foi a função de pontuação escolhida com o menor valor *RMSD* (*Root Mean Square Deviation*) 0,087 Å e com a maior pontuação de ancoramento, por isso foi selecionada para procedimentos subsequentes neste estudo. No programa *GOLD*, a função de acoplamento produz uma "pontuação de aptidão", que é um valor adimensional. O valor da pontuação é um guia de quão boa é a postura de encaixe. Quanto maior a pontuação, melhor a interação entre o ligante e o local de ligação. Usou-se a função de pontuação de aptidão *ChemPLP* para prever a interação efetiva de todos os compostos naturais escolhidos para este trabalho com a enzima AChEhr. O Programa *Spartan'14* (*Wavefunction Inc.*) foi utilizado para construir e otimizar as estruturas químicas em estudo, com o método PM6. Foram geradas as figuras mostrando a interação 3D dos ligantes e do AChEhr com o programa *PyMol* 0.99 (*DeLano Scientific LLC*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As melhores pontuações de aptidão em comparação com o **GNT** foram apresentadas pelos compostos **a-b**. As pontuações de **a-f** foram menores que o **GNT**, mas **a-b** apresentam interações adicionais de ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas similares (Tabela 1).

Table 1. Pontuações de aptidão (função *ChemPLP*) obtidas por *docking* molecular em AChEhr.

Ligante	Pontuação	Interações de ligação de hidrogênio	Interações hidrofóbicas
GNT	72.78	Glu202, Ser203, Tir337	His447, Fen338, Tir337, Fen297, Fen295, Trp86
a	60.07	Gli121, Gli122, Ala204, Tir124	His447, Tir341, Fen338, Tir337, Fen297, Fen295
b	54.11	Gli122	Tir341, Fen338, Tir337, Fen297
c	41.90	Gli121, Gli122, Ala204, Tir124,	Tir341, Fen338, Tir337, Fen297
d	41.58	Tir337	Tir341, Tir124, Tir337, Trp86,
e	28.41	Tir124, Fen295, Arg296	Tir341, Fen338, Tir337, Fen297
f	27.65	Gli121, Ser203, Ala204	Ala204, His447, Fen338, Fen297, Tir124

Enquanto a **GNT** interage por ligação hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Glu202, Ser203 e Tri337, uma interação com Gli121, Gli122, Ala204 e Tri124, e **b** interagem com Gli122 e Ala204. Essas diferenças podem ser interessantes para outros modos de ligação e para estudar novos derivados sintéticos de **a-b**. As interações hidrofóbicas de **a-b** são semelhantes quando comparadas com o **GNT** corroborando para esses escores de aptidão, mostrando que o modo de ligação no sítio ativo da enzima é semelhante, as interações em comum são com resíduos His447, Fen338, Tir337 e Phe297.

A Figura 2 apresenta as melhores posições de acoplamento do **GNT** e **a-b** no sítio ativo da enzima AchEhr.

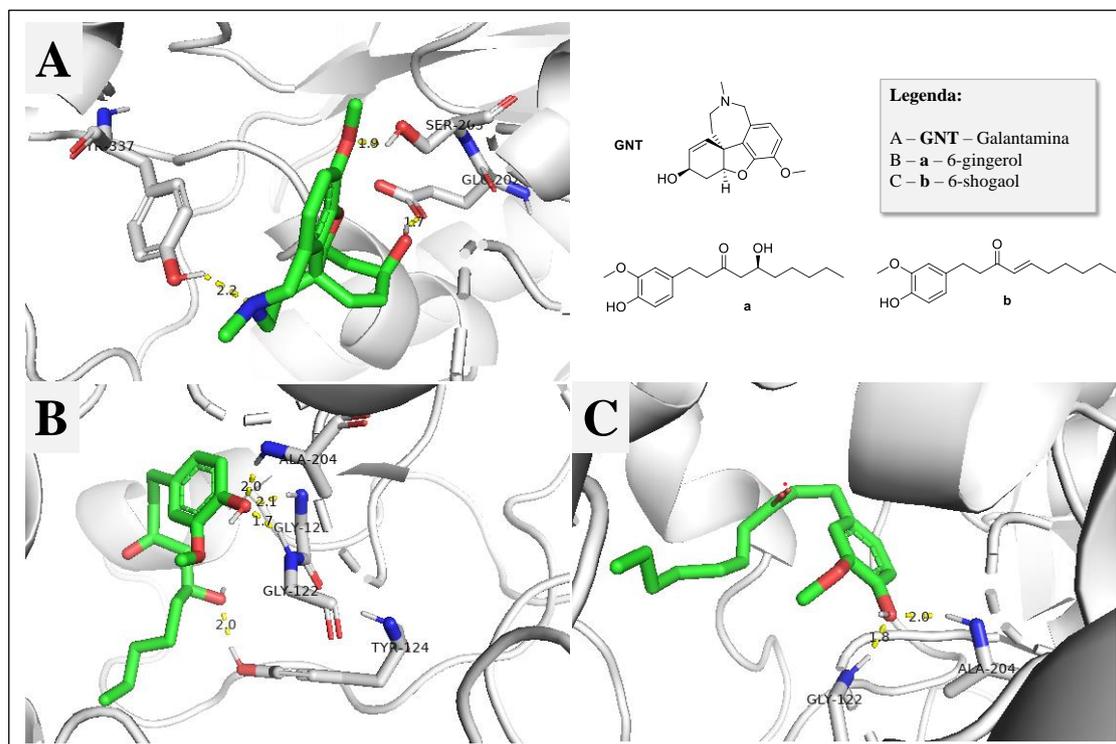


Figura 2. Posições de interação de **GNT** (parte A), **a** (parte B) e **b** (parte C) com AChE obtidas por ancoramento molecular (função *ChemPLP*). Código de cor: átomos de oxigênio, vermelho; átomos de nitrogênio, azul; átomos de hidrogênio, branco; átomos de carbono, verde. Linha amarela tracejada: distância de ligação de hidrogênio (Å). Figura gerada com o programa *PyMol* 0,99 (*DeLano Scientific* LLC).

Na Figura 2 parte A pode ser visualizado o resíduo Tir337 e Ser203 doando uma ligação de hidrogênio ao nitrogênio heterocíclico e ao átomo de oxigênio do grupo metoxila da **GNT**, além de aceitar ligação de hidrogênio por um grupo hidroxila da **GNT** ao grupo carbonila de Glu202. A parte B da Figura 2 é demonstrado que o resíduo Tri124, Gli121, Gli122 e Ala204 realizando ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila e o grupo de fenóxido de **a**. E, finalmente, a parte C da Figura 2 mostra apenas os resíduos Gli122 e Ala204 fazendo ligação de hidrogênio para o grupo de fenóxido de **b**.



Para avaliar a drogabilidade dos produtos naturais estudados, prosseguimos com avaliações *in silico* que mostravam um perfil ADMET interessante para esses compostos. Foram analisados parâmetros como área de superfície polar topológica (*TPSA*), registro de consenso log *P*, log *S*, absorção intestinal humana (*HIA*), permeação da barreira cerebral sanguínea (*BBB*) e substrato de glicoproteína P (*P-gP*) e o perfil de semelhança com drogas – *ESM* (DAINA *et al.*, 2017). Os valores *TPSA* e o registro de consenso log *P* variam de 38,77 a 93,06 e 1,92 a 3,76, respectivamente. A polaridade moderada e as características lipofílicas relativas colocam os compostos **a-b** e **d-f** no compartimento amarelo do modelo *BOILED-Egg* (Figura 3), tendo alta probabilidade de absorção gastrointestinal e acesso ao sistema nervoso central – SNC (DAINA *et al.*, 2016 SANTOS *et al.*, 2019) que é fundamental para a distribuição de moléculas de ação central.

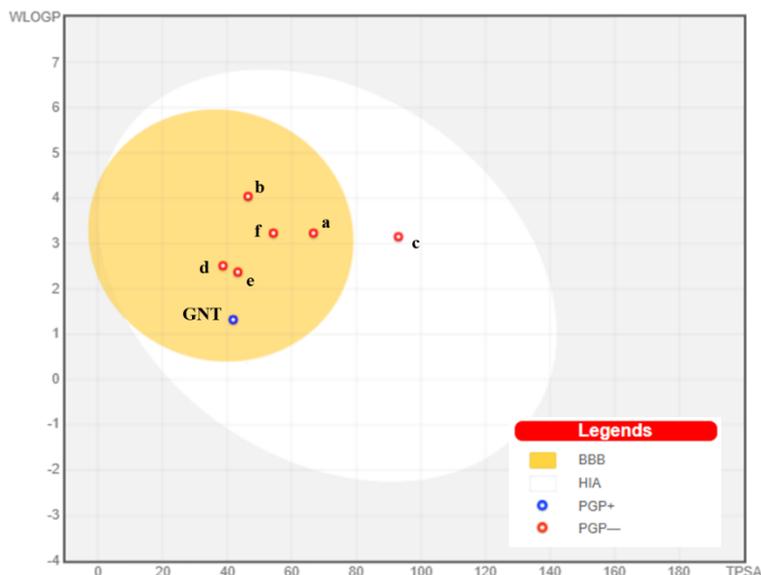


Figura 3. Modelo de ADMET *BOILED-Egg* para os compostos **a-f**, respectivamente, em comparação com o padrão galantamina (**GNT**). (*HIA*) absorção gastrointestinal; (*BBB*) penetração cerebral; (*PGP_b*) substrato para glicoproteína-P; (*PGP₋*) não é um substrato para P-glicoproteína.

Compostos **a-b** têm propriedades ADMET melhores que a **GNT**, e seus derivados podem ser uma abordagem sintética interessante. O composto **c** pode ser descartado nesta análise porque não tem uma probabilidade de acesso ao SNC. Além disso, os compostos **a-b** com a melhor interação com a enzima AChE no estudo *in silico*, não foram considerados substratos P-gP e têm um bom perfil de semelhança com drogas sem nenhuma violação nas regras Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2001), Ghose (GHOSE *et al.*, 1999), Veber (VEBER *et al.*, 2002), Egan (EGAN *et al.*, 2000) e Muegge (Muegge *et al.*, 2001).



CONCLUSÕES

Os compostos 6-gingerol e 6-shagaol (**a-b**) possuem interessantes interações *in silico* com a enzima AChEhr em comparação a galantamina (**GNT**), além de possuírem propriedades ADMET indicando possível acesso ao SNC. Estes resultados levam a um forte indicativo de que estudos mais aprofundados com estes compostos podem ser promissores e que a investigação de outros alvos moleculares *in silico* é possível utilizando metodologias análogas à usada neste trabalho. A busca por novos derivados de **a-b** inspiraram novos estudos *in silico* e de modificações sintéticas pelos autores.

REFERÊNCIAS

AHMED, S.; KHAN, S. T.; ZARGAHAM, M. K.; KHAN, A. U.; KHAN, S.; HUSSAIN, A.; UDDIN, J.; KHAN, A.; AL-HARRASI, A. Potential therapeutic natural products against Alzheimer's disease with Reference of Acetylcholinesterase. **Biomed Pharmacother**, v. 139, p. 111609-111620, 2021.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 258-285, 2006.

CRAIG, L. A.; HONG, N. S.; MCDONALD, R. J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, p. 1397-1409, 2011.

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**, v. 7, p. 42717-42730, 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **Chem Med Chem**, v. 11, p. 1117-1121, 2016.



DOS SANTOS, T. C.; GOMES, T. M.; PINTO, B. A. S.; CAMARA, A. L.; PAES, A. M. A. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 1192-1196, 2018.

EGAN, W.J.; MERZ, K.M.; BALDWIN, J.J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **J Med Chem**, v. 43, p. 3867-3877, 2000.

FERRI, C.P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATIGLIONI, L.; GANGULI, M.; HALL, K.; HASEGAWA, K.; HENDRIE, H.; HUANG, Y.; JORM, A.; MATHERS, C.; MENEZES, P. R.; RIMMER, E.; SCAZUFCA, M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **Lancet**, v. 366, p. 2112-2117, 2006.

FISH, P.V.; STEADMAN, D.; BAYLE, E.; WHITING, P. New approaches for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 29, p. 125-133, 2019.

GHOSE, A.K.; VISWANADHAN, V.N.; WENDOLOSKI, J.J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **J Comb Chem**, v. 1, p. 55-68, 1999.

HOLMES, C.; CUNNINGHAM, C.; ZOTOVA, E.; CULLIFORD, D.; PERRY, V.H. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. **Neurology**, v. 77, p. 212-218, 2011.

LEE, J.; JUN, M. Dual BACE1 and Cholinesterase Inhibitory Effects of Phlorotannins from *Ecklonia cava*—An In Vitro and in Silico Study. **Mar Drugs**, v. 17, p. 91-94, 2019.

LEE, S.; YOUN, K.; LIM, G.; LEE, J.; JUN, M. In silico docking and in vitro Approaches towards BACE1 and Cholinesterases Inhibitory Effect of Citrus Flavanones. **Molecules**, v. 23, p. 1509-1513, 2018.

LINDEBOOM, J.; WEINSTEIN, H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. **Eur J Pharmacol**, v. 490, p. 83-86, 2004.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, p. 3-26, 2001.



MOODIE, L. W. K.; SEPCIC, K.; TURK, T.; FRANGE, Ž. R.; SVENSON, J. Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms. **Nat Prod Rep**, v. 36, p. 1053-1092, 2019.

MUEGGE, I.; HEALD, S.L.; BRITTELLI, D. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. **J Med Chem**, v. 44, p. 1841-1846, 2001.

SANABRIA-CASTRO, A.; ALVARADO-ECHEVERRÍA, I.; MONGE-BONILLA, C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. **Ann Neurosci**, v. 24, p. 46-54, 2017.

SANTOS, S. N.; ALVES DE SOUZA, G.; PEREIRA, T. M.; FRANCO, D. P.; DE NIGRIS DEL CISTIA, C.; SANT'ANNA, C. M. R.; LACERDA, R. B.; KÜMMERLE, A. E. Regioselective microwave synthesis and derivatization of 1,5-diaryl-3-amino-1,2,4-triazoles and a study of their cholinesterase inhibition properties. **RSC Advances**, v. 9, p. 20356-20369, 2019.

VEBER, D.F.; STEPHEN, R.J.; HUNG-YUAN, C. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem**, v. 45, p. 2615-2623, 2002.

VIEGAS-JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

YUAN, H.; FANGLIN, X.; HENGMAO, L.; FEI, X.; XIAO-YU, L.; HAO, S.; YONG, Q. Asymmetric Total Synthesis of (+)-21-epi-Eburnamonine Via a Photocatalytic Radical Cascade Reaction. **Nat Prod Bioprospec**, v. 11, p. 99-103, 2021.