



JULIANA DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDOS *in silico* DE POTENCIAIS
INIBIDORES DA ENZIMA DI-HIDRIFOLATO
REDUTASE DE *Bacillus anthracis* E DE UMA
OXIMA REATIVADORA DA
ACETILCOLINESTERASE**

LAVRAS – MG

2013

JULIANA DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDOS *in silico* DE POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA DI-
HIDROFOLATO REDUTASE DE *Bacillus anthracis* E DE UMA OXIMA
REATIVADORA DA ACETILCOLINESTERASE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Teodorico de Castro Ramalho

Coorientador

Dr. Tanos Celmar Costa França

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos
Técnicos da Biblioteca da UFLA**

Silva, Juliana de Oliveira.

Estudos *in silico* de potenciais inibidores da enzima di-hidrifolato redutase de *Bacillus anthracis* e de uma oxima reativadora da acetilcolinesterase / Juliana de Oliveira Silva. – Lavras : UFLA, 2013.

108 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Teodorico de Castro Ramalho.

Bibliografia.

1. *Docking*. 2. Guerra química. 3. Guerra biológica. 4. QM/MM.
5. Dinâmica molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD –615.35

JULIANA DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDOS *in silico* DE POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA
DIHIDRIFOLATO REDUTASE DE *Bacillus anthracis* E DE UMA
OXIMA REATIVADORA DA ACETILCOLINESTERASE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha UFLA

Dr. Luciano Tavares da Costa UNIFAL

Dr. Matheus Puggina de Freitas UFLA

Dr. Teodorico de Castro Ramalho
Orientador

LAVRAS - MG

2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço Àquele que é e sempre será meu Deus, meu melhor amigo, meu maior e verdadeiro Mestre. Obrigada por cuidar de mim e sempre preparar o melhor caminho para eu trilhar. Sem Ti nada sou!!!

Não podia deixar de agradecer aos meus pais, Jurandir e Jovita, por tornarem tudo isso possível. Agradeço pela persistência, o amor, as correções, os ensinamentos e por serem responsáveis por me tornar uma pessoa, não perfeita, mas com algo que faz toda a diferença, uma pessoa de caráter.

Aos meus irmãos, Juliano, Jacqueline e Marcelo; à minha cunhada, Flávia e aos meus sobrinhos, Otávio e Rafael. Obrigada pelo convívio, pelo amor e pela compreensão. Com vocês do meu lado tudo se torna mais simples.

Ao grande amor da minha vida, Carmelo, por se tornar tão essencial para mim. Obrigada pela ajuda, compreensão, paciência, por me escutar, me consolar e sempre me instigar a continuar crendo que tudo dará certo.

Aos meus amigos da IBVBI, deixo meus agradecimentos pelas orações, palavras de encorajamento e descontrações.

Aos professores e colegas do Laboratório de Modelagem Molecular, agradeço o auxílio em todo o tempo, não importando a hora, o local e a forma. Obrigada pela colaboração.

Ao meu orientador, Teodorico e meu coorientador, Tanos, por acreditarem no meu potencial e por todos os ensinamentos que sempre me acompanharão.

Aos membros da banca, professores Luciano, Matheus e Elaine e à doutora Melissa, pela disposição e pelas considerações que certamente complementarão meu trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Instituto Militar de Engenharia, pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

Ao CNPq, à CAPES e ao Ministério da Defesa (Edital CAPES/PRODEFESA 2008), pelo financiamento dos recursos necessários para o desenvolvimento do presente trabalho.

RESUMO GERAL

Armas químicas e biológicas são classificadas como armas de destruição em massa, pois, quando utilizadas, têm a capacidade de causar grande número de mortes. O baixo custo, a facilidade na fabricação, os avanços da biotecnologia e a facilidade de se esconder instalações de produção das armas químicas e biológicas as tornam cada vez mais atrativas para grupos terroristas. Atualmente, percebe-se que nenhum país do mundo encontra-se em condições ideais para enfrentar um ataque com esse tipo de armas. Assim, além do preparo militar, é essencial a busca por novos fármacos, bem como novos alvos moleculares, para o desenvolvimento de novos antídotos e/ou fármacos contra essas armas. Este trabalho foi realizado em duas etapas: primeiramente, foi realizado um estudo referente à guerra química, no qual se analisou a reativação pela oxima BI-6 da enzima acetilcolinesterase inibida por diferentes organofosforados. Para tal, foi aplicada uma metodologia teórica de *docking* e QM/MM, utilizando-se os softwares Molegro® e Spartan®. A segunda parte do trabalho refere-se à guerra biológica e consistiu da avaliação da seletividade de inibidores da enzima di-hidrofolato redutase de *Bacillus anthracis* (BaDHFR), correlação entre resultados experimentais e teóricos e proposição de uma nova estrutura que pode apresentar melhor capacidade inibitória. Para esta etapa, além de estudos de *docking*, foram realizados cálculos de dinâmica molecular por meio do programa GROMACS. É importante ressaltar que o emprego de técnicas de química computacional no estudo de questões relativas a agentes químicos e biológicos de guerra é especialmente útil como forma de reduzir a necessidade de manipulação dessas substâncias em laboratório, além de promover economia de investimentos com reagentes e materiais, e ganho de tempo na busca por novos antídotos e fármacos.

Palavras-chave: Guerra biológica. Guerra química. Inibidores. Reativadores. Di-hidrofolato redutase. Acetilcolinesterase. Oximas.

GENERAL ABSTRACT

Chemical and biological weapons are classified as weapons of mass destruction, because when used has the ability to cause large numbers of deaths. The low cost, ease of manufacturing, advances in biotechnology and the ease of hiding production facilities of chemical and biological weapons makes them increasingly attractive to terrorist groups. Currently it is clear that no country in the world is in ideal conditions to meet an attack with such weapons. Thus, besides the military preparation is essential to the search for new drugs and new molecular targets for the development of new antidotes and/or drugs against biological and chemical weapons. This study was conducted in two stages: first a study on the chemical warfare in which we analyzed the reactivation by oxime BI-6 enzyme acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus. To this was applied a theoretical methodology docking and QM/MM using the software Spartan® and Molegro®. The second part refers to biological warfare and consisted of assessing the selectivity of inhibitors of the enzyme dihydrofolate reductase from *Bacillus anthracis* (BaDHFR), and correlation between experimental and theoretical results and propose a new framework that can provide better inhibitory ability. For this step, and docking studies were performed molecular dynamics calculations using the program GROMACS. Importantly, the use of computational chemistry techniques in the study of issues related to chemical and biological warfare is especially useful as a way to reduce the need for handling these substances in the laboratory, saving reagents and materials investments and gain time the search for new drugs and antidotes.

Keywords: Biowarfare. Chemical warfare. Inhibitors. Reactivators. Dihydrofolate reductase. Acetylcholinesterase. Oximes.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	O ciclo do antraz. (ANTRAX, 2008).....	24
Figura 2	Reação da di-hidrofolato redutase.....	27
Figura 3	Estrutura dos inibidores da enzima <i>Ba</i> DHFR	28
Figura 4	Estruturas de alguns agentes dos nervos	32
Figura 5	Sítio ativo da AChE (OBREGON, 2006; MATOS, 2012)	34
Figura 6	Esquema da inibição da AChE por OP, sendo, R ₁ o grupo alquil, O-alquil ou amida; R ₂ o grupo O-alquil ou amida; e X o grupo abandonador	35
Figura 7	Esquema da reativação espontânea e do envelhecimento, sendo, R o grupo alquil, O-alquil ou amida; R ₁ o grupo O-alquil ou amida (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; MATOS, 2012)	36
Figura 8	Reação de reativação do conjugado AChE-OP por uma oxima, sendo R o grupo alquil, O-alquil ou amida; R ₁ o grupo O-alquil ou amida.....	37
Figura 9	Estrutura química das oximas	38
Figura 10	Esquema da abordagem híbrida mecânica quântica/mecânica molecular (QM/MM). A enzima e o solvente são tratados ao nível da teoria MM. A parte QM inclui os átomos envolvidos na reação enzimática (VIVO, 2011)	46

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figure 1	Inhibitors studied. Structures of the DHFR inhibitors	64
Figure 2	Validation of the docking. Re-docking of 5-[3-(2,5-dimethoxyphenyl)prop-1-yn-1-yl]-6-ethylpyrimidine-2,4-diamine (Compound 1) inside <i>Ba</i> DHFR (A) and TMP inside <i>Hss</i> DHFR (B).....	68
Figure 3	Experimental results <i>versus</i> theoretical results. Correlation between the intermolecular interaction energies (kcal mol ⁻¹) and pIC ₅₀ (μM) for inhibitors 1–11 inside <i>Ba</i> DHFR [15]	70

Figure 4	Experimental results <i>versus</i> theoretical results. Correlation between the intermolecular interaction energies (kcal mol ⁻¹) and pIC ₅₀ (μM) for inhibitors 1 – 11 inside <i>Hss</i> DHFR [15].....	71
Figure 5	Hydrogen interactions. Molecular interactions of inhibitor 1 inside <i>Ba</i> DHFR (left) and <i>Hss</i> DHFR (right)	73
Figure 6	Temporal RMSD of the system <i>Ba</i> DHFR/Inhibitor 1 during MD simulation. The enzyme curve is shown in black and the inhibitor curve is shown in red	76
Figure 7	Dynamic frames. Inhibitor 1 inside the active site of <i>Ba</i> DHFR during the MD simulation. The cofactor was omitted for better visualization	77
Figure 8	Number of H-bonds. Interactions between inhibitor 1 and <i>Ba</i> DHFR during the MD simulation	78
Figure 9	Proposed structure. Structure to be modified at positions R ₁ and R ₂	79
Figure 10	Hydrogen interactions. Molecular interactions between prototype 12 and <i>Ba</i> DHFR (left) and <i>Hss</i> DHFR (right).	81
Figure 11	Dynamic frames. Prototype 12 inside <i>Ba</i> DHFR. The cofactor was omitted for better visualization	82

ARTIGO 2

Figure 1	Reaction reactivation of OP-AChE conjugate by an oxime, where R is alkyl, O-alkyl or amide; R1 group or O-alkyl amide	92
Figure 2	Scheme of AChE reactivation by an oxime	92
Figure 3	Structures of oximes HI-6 and BI-6	93
Figure 4	Structure of organophosphates studied: (1) Cyclosarin; (2) Soman; (3) VX and (4) Sarin	94
Figure 5	Cavity of <i>Mm</i> AChE containing the oxime BI-6 and organophosphate sarin.....	96
Figure 6	Hydrogen bonds formed between BI-6 and residues of the <i>Mm</i> AChE active site. The reactivators are indicated in the figure itself.....	98
Figure 7	Plot of reactivation % <i>versus</i> interaction energy for the systems studied	99
Figure 8	Plot of % Reactivation <i>versus</i> ΔΔE [#] for the studied systems	101
Figure 9	Correlation between the values of experimental and % reactivation calculated.....	102

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Fatos históricos de uso de armas químicas	30
----------	---	----

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Table 1	IC ₅₀ (μM) values of the DHFR inhibitors	65
Table 2	Docking results and pIC ₅₀ (pIC ₅₀ = -logIC ₅₀ (μM)) values for inhibitors 1 – 11 inside <i>Ba</i> DHFR	69
Table 3	Docking results and pIC ₅₀ (pIC ₅₀ = -logIC ₅₀ (μM)) values for inhibitors 1 – 11 inside <i>Hss</i> DHFR	70
Table 4	Docking results for inhibitors 1, 3, 4 and 11 inside <i>Ba</i> DHFR and their pIC ₅₀ values	72
Table 5	Docking results for inhibitors 1, 3, 4 and 11 inside <i>Hss</i> DHFR and their pIC ₅₀ values	74
Table 6	Modifications performed and estimated values of intermolecular energy (kcal mol ⁻¹) used for evaluation of the best binding modes	79

ARTIGO 2

Table 1	Docking results for the BI-6 docked in <i>Mm</i> AChE.....	97
Table 2	Experimental results, intermolecular energy and relative activation energies for the studied compounds.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
a.C	Antes de Cristo
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChE-OP	Acetilcolinesterase inibida por organofosforado
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
<i>Ba</i> DHFR	Di-hidrofolato redutase de <i>Bacillus anthracis</i>
Cia Def QBN	Companhia de Defesa Química, Biológica e Nuclear
DHFR	Di-hidrofolato redutase
Glu	Glutamato ou ácido glutâmico, dependendo do pH
Gly	Glicina
His	Histidina
<i>Hs</i> DHFR	Di-hidrofolato redutase humana
Ile	Isoleucina
Lis	Lisina
<i>Mm</i> AChE	Acetilcolinesterase <i>Mus musculus</i> (camundongo)
OP	Organofosforado
Phe	Fenilalanina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

LISTA DE SIGLAS

AM1	Método semiempírico de química computacional Austin Model 1
B3LYP	Método DFT de Becke, usando correlação de Lee, Yang e Parr
Cia Def QBN	Companhia de Defesa Química, Biológica e Nuclear
CPAB	Convenção para Prevenção de Armas Biológicas
CPAQ	Convenção para Prevenção de Armas Químicas
DHFR	Di-hidrofolato redutase
DNA	ADN, em português: ácido desoxirribonucleico; ou DNA, em inglês: deoxyribonucleic acid
EsIE	Escola de Instrução Especializada
EUA	Estados Unidos da América
GROMACS	<i>GR</i> Oningem <i>MA</i> chine for <i>Ch</i> emical <i>Si</i> mulation
GROMOS	<i>GR</i> Oningem <i>MO</i> lecular <i>Si</i> mulation
GTO	Função de base do tipo Gaussiana
LMDQB	Laboratório de Modelagem Molecular Aplicada à Defesa Química e Biológica
LMM	Laboratório de Modelagem Molecular
MD	Dinâmica molecular
MM	Mecânica Molecular
MTX	Metotrexato
MVD	Molegro Virtual Docker
ONU	Organização das Nações Unidas
OTAN	Organização do Tratado do Atlântico Norte
PDB	Protein Data Bank
PM3	Método semiempírico de química computacional
QM	Mecânica Quântica
SM	Semiempírico
STO	Função de base do tipo Slater
TMP	Trimetropim
TS	Estado de transição

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
cm	Centímetro
F	Flúor
fs	Fentossegundos
H	Hidrogênio
K	Kelvin
nm	Nanômetro
ns	Nanossegundos
μM	Micromolar
Φ	Ângulo phi
Ψ	Ângulo psi

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	16
	INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO	16
1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Armas químicas e biológicas	18
2.2	Guerra biológica	19
2.2.1	Utilização de agentes biológicos em guerras e bioterrorismo	20
2.2.2	O <i>Bacillus anthracis</i> e o antraz	23
2.2.3	Di-hidrofolato redutase	26
2.3	Guerra química	29
2.3.1	Utilização de armas químicas em guerras	30
2.3.2	Agentes neurotóxicos	31
2.3.3	Acetilcolinesterase	33
2.3.3.1	Inibição, envelhecimento e reativação da AChE	35
2.3.4	Oximas	37
2.4	Modelagem molecular	38
2.5	Mecânica molecular	39
2.6	Ancoramento molecular (<i>docking</i>)	41
2.7	Dinâmica molecular	42
2.8	Associação entre <i>docking</i> e dinâmica molecular	45
2.9	Os métodos híbridos-QM/MM	46
	REFERÊNCIAS	47
	SEGUNDA PARTE	59
	ARTIGO 1 Molecular modeling toward selective inhibitors of dihydrofolate reductase from the biological warfare agent <i>Bacillus anthracis</i>	59
	ARTIGO 2 Molecular modeling studies between oxime BI-6 and <i>Mm</i>AChE inhibited by different organophosphorus	88

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os agentes de guerra química e biológica constituem uma classe de armas não convencionais, de mais baixo custo, de mais difícil detecção e capazes de causar destruição de vidas de maneira sem precedente na história da humanidade. Essas características tornam alto o seu potencial uso por grupos terroristas. O emprego desse tipo de arma é fato recorrente ao longo da história, desde a Antiguidade, mas sua utilização em larga escala teve início apenas na I Guerra Mundial, quando o advento da industrialização tornou possível a produção de grandes quantidades desses agentes (GONÇALVES, 2009; FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010).

A facilidade com que muitas armas químicas podem ser produzidas, os avanços da biotecnologia e a facilidade de esconder instalações de produção de armas biológicas, as quais podem ser confundidas com um laboratório comum, tornam tais armas uma opção cada vez mais atrativa para grupos terroristas (FRANÇA et al., 2008).

Atualmente, pode-se afirmar que nenhum país do mundo encontra-se em condições ideais para enfrentar um ataque com armas químicas e/ou biológicas. Surpreendentemente, nenhum grupo terrorista ou paramilitar tem feito uso eficiente desse tipo de arma nos últimos anos, porém, acredita-se que, na situação geopolítica atual, ataques desse tipo sejam apenas uma questão de tempo (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010; LINDLER; LEBEDA; KORCH, 2004).

O objetivo principal, neste trabalho, é o estudo, em âmbito molecular, de potenciais inibidores e reativadores relacionados à pesquisa com guerra química e biológica. Para isso, utilizaram-se técnicas de modelagem molecular, como *docking*, dinâmica molecular e estudos híbridos QM/MM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Armas químicas e biológicas

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 1969), armas de destruição em massa são aquelas que, quando utilizadas, têm a capacidade de causar um grande número de mortes em uma única utilização. Recebem essa designação as armas nucleares, químicas e biológicas, as quais representam uma ameaça quase inimaginável para a sociedade (AMILTAI et al., 2010).

Os agentes de guerra química e biológica constituem uma classe de armas não convencionais, de mais baixo custo, mas de difícil detecção e controle (TAYLOR; TAYLOR JÚNIOR, 1992; HERRMANN et al., 1999; FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010). Em se tratando da produção desses agentes, não há grandes obstáculos técnicos, como no caso das armas nucleares. A cultura de agentes biológicos em laboratório é feita por técnicas básicas de microbiologia, utilizando materiais de amplo emprego e fácil aquisição. Amostras desses microrganismos são rotineiramente comercializadas para fins de pesquisa de vacinas e medicamentos, podendo também, em certos casos, ser obtidas diretamente de animais infectados na natureza (FRANÇA et al., 2008). Agentes químicos, por sua vez, podem ser produzidos em larga escala em praticamente qualquer instalação industrial.

A Convenção para a Proibição de Armas Químicas (CPAQ) (<http://www.opcw.org/>) e a Convenção para a Proibição de Armas Biológicas (CPAB) (<http://www.opbw.org/>), promovidas pela ONU, proíbem o uso desse tipo de arma por parte de qualquer um dentre os países signatários (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010). Ambas as convenções têm tido sucesso no controle da

proliferação e na destruição dos arsenais de armas químicas e biológicas das principais potências do mundo (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010).

2.2 Guerra biológica

Guerra biológica consiste no emprego de microrganismos, podendo ser bactérias, vírus ou toxinas (substâncias tóxicas produzidas por seres vivos), retirados do meio ambiente ou produzidos em laboratório. Segundo o manual de aspectos médicos das operações de defesa química, biológica e nuclear da Organização do Tratado do Atlântico Norte (DEPARTMENT OF THE ARMY FIELD MANUAL FM 8-9, 1996), a guerra biológica tem a finalidade de causar doenças e mortes em pessoas, animais ou danificar plantas e materiais. Os agentes biológicos clássicos são bactérias, vírus, fungos, protozoários e toxinas. Essas últimas, em particular, por se tratarem de substâncias químicas tóxicas, são incluídas tanto na categoria de armas químicas como biológicas, sendo banidas tanto pela CPAQ quanto pela CPAB. As armas biológicas são, fundamentalmente, diferentes das químicas, no que diz respeito às seguintes características:

- a) habilidade do microrganismo em se reproduzir no hospedeiro;
- b) efeito retardado. Os sintomas resultantes da contaminação por um microrganismo aparecem apenas após um período específico para cada agente, conhecido como período de incubação, dificultando a identificação da origem de um ataque;
- c) a inexistência, atualmente, de detectores biológicos com as mesmas capacidades dos detectores químicos (portáteis, confiáveis e rápidos), dificultando a identificação de um ataque biológico antes que seus efeitos se espalhem;

- d) impacto psicológico ainda maior que o das armas químicas;
- e) relativa simplicidade e baixo custo de produção;
- f) possibilidade de disseminação por meio de animais e insetos (vetores) (TAYLOR; TAYLOR JÚNIOR, 1992; SIDELL; TAKAFUJI; FRANZ, 1997; FRANÇA et al., 2008).

Vários fatores contribuem para dificultar a defesa civil contra um ataque terrorista, ou mesmo convencional, por agentes biológicos. Equipes civis de emergência, geralmente, não possuem equipamentos de proteção e detecção, nem são treinadas especificamente para a resposta a esse tipo de incidente. No caso específico de agentes biológicos, a identificação de um ataque é complicada pela inexistência de detectores com desempenho satisfatório e pelo período de incubação da doença, que dificulta a determinação da origem do ataque. Além disso, nem sempre é possível distinguir entre um ataque biológico e uma epidemia natural (FRANÇA et al., 2008).

2.2.1 Utilização de agentes biológicos em guerras e bioterrorismo

León-Rosales (2001) cita, em seu trabalho, os principais microrganismos tidos como preferenciais para serem utilizados em guerras biológicas. Dentre eles, destacam-se *Bacillus anthracis*, causador do antraz; *Brucella* sp., causadora da brucelose; *Francisella tularensis*, causadora da tularemia; *Yersinia pestis*, causadora da peste; *Coxiella burnetii*, causadora da febre Q; *Orthopoxvirus variolae*, causador da varíola e o *Clostridium botulinum*, causador do botulismo.

É possível citar vários relatos na história sobre a utilização de agentes infecciosos como arma em conflitos. Estudiosos consideram que a primeira notícia de uma provável guerra biológica seria a chamada “quinta praga” do Egito, ocorrida no século XV a.C., a qual resultou em um elevado índice de

mortalidade. De acordo com a Bíblia, o próprio Faraó (livro do Êxodo, capítulo 9, versículos 4 e 6) foi contaminado, sugerindo que houve a introdução estratégica do agente, provavelmente o *Bacillus anthracis* (FERNANDES, 2002).

No ano de 1346, os tártaros que invadiram Kaffa (atual Feodósia), na península da Crimeia, utilizaram cadáveres de soldados infectados pela bactéria da peste (*Yersinia pestis*) como arma biológica. Os corpos eram catapultados para dentro da cidade sitiada. Os ratos e as pulgas, que na época infestavam as cidades, eram os responsáveis pela transmissão da doença à população (RIEDEL, 2004; FERNANDES, 2002). Acredita-se que esse episódio desencadeou a pandemia de peste negra do século XIV, que ceifou milhões de vidas na Europa.

Em 1763, o exército britânico na América, em guerra com os franceses, mandou cobertores e lençóis, previamente utilizados num hospital para pacientes com varíola, para os índios Delaware, aliados dos franceses (CHRISTOPHER et al., 1997).

Com o surgimento da microbiologia de Pasteur e Koch, a guerra biológica poderia ser levada a novas e catastróficas dimensões. Reconhecendo isso, duas declarações internacionais (1874, em Bruxelas e 1899, em Haia) tentaram proibir o seu uso (LEITENBERG, 2001; FRIEDRICH, 2003; FRISCHKNECHT, 2003).

Durante a Segunda Guerra Mundial e até o início dos anos 1970, surgiram várias acusações de uso de armas biológicas contra Japão, Alemanha, Inglaterra e EUA. Com exceção dos japoneses, nenhuma dessas acusações foi realmente comprovada. O Japão foi acusado de lançar pulgas contaminadas com peste bubônica sobre onze cidades chinesas, o que causou uma epidemia nunca antes registrada naqueles locais. O Japão também possuía, em seu exército, duas unidades dedicadas às armas biológicas (CHRISTOPHER et al., 1997;

OSTERHOLM, 2001; HARRIS, 2002; TASCHELO, 2002; FRANÇA et al., 2008). A primeira, chamada de unidade 731, usou prisioneiros de guerra como cobaias para experimentos com antraz, botulismo, brucelose, cólera, disenteria, gangrena gasosa, infecções meningocócicas, peste bubônica e tetrodoxina. A outra unidade, batizada de unidade 100, era responsável pela construção de armas biológicas (HARRIS, 1992; HARRIS, 2002; FRISCHKNECHT, 2003; FRANÇA et al., 2008).

Durante a Guerra Fria, os Estados Unidos e a então União Soviética implantaram projetos para o desenvolvimento de armas de natureza biológica, da mesma maneira que o Canadá e o Reino Unido. Em 1972, o tratado sobre armas tóxicas e biológicas foi assinado e ratificado por diversos países, mas não todos. Apesar da existência do tratado, pelo menos dez países teriam mantido e expandido seus programas de desenvolvimento de armas biológicas (OSTERHOLM, 2001).

A facilidade de produção dos agentes químicos e biológicos, seu baixo custo e a grande quantidade de informações disponíveis sobre o assunto, inclusive na internet, tornaram esse tipo de arma muito atrativa para grupos terroristas motivados por ideologias de extrema direita, ódio racial, fanatismo religioso ou filosofias apocalípticas (ATLAS, 2001; TASCHELO, 2002; FRANÇA et al., 2008). Mesmo que ainda não tenha sido registrado um ataque terrorista de grandes proporções envolvendo agentes biológicos, muitos especialistas afirmam que é apenas uma questão de tempo, uma vez que é quase impossível evitar um ataque como esses (FRANÇA et al., 2008). Tem sido cada vez maior o número de incidentes envolvendo tentativas de aquisição e ou utilização desses agentes. Entre eles, podem-se citar, segundo Tascheto (2002) e França et al. (2008):

- a) em 1972, foram descobertos, em poder de uma organização chamada “Order of the Rising Sun”, de 30 a 40 kg de culturas da bactéria causadora do tifo, destinados a um ataque aos suprimentos de água de várias cidades norte-americanas;
- b) vários incidentes foram registrados nos EUA, nas décadas de 1980 e 90, envolvendo tentativas de produção e utilização de ricina, por grupos de extrema direita;
- c) em 1984, membros de um grupo religioso no Oregon, EUA, contaminaram 10 restaurantes com *Salmonella typhimurium*, resultando em infecções gastrintestinais (gastroenterite) em 751 pessoas;
- d) em 1995, um militante de extrema direita nos EUA comprou, pelo correio, cultura de peste bubônica da American Type Culture Collection (ATCC), uma empresa especializada na venda de insumos para pesquisa biológica, que também forneceu culturas de *Bacillus anthracis* e *Clostridium botulinum* para o Iraque, no início da década de 1980;
- e) em 2001, algumas cartas contaminadas com *Bacillus anthracis* foram postadas nos EUA. Cinco pessoas morreram e, até o momento, o governo norte-americano ainda não identificou os responsáveis.

2.2.2 O *Bacillus anthracis* e o antraz

Bacillus anthracis é uma bactéria gram-positiva, aeróbia, formadora de esporos, que causa a doença conhecida como antraz, principalmente em animais herbívoros, mas também pode causar a doença aguda em humanos (VERMA; HANSCH, 2008; KUROSAKI et al., 2009; IRENGE; GALA, 2012). O *B.*

anthracis existe em duas formas morfológicamente distintas, o bacilo metabolicamente ativo e os esporos dormentes (CARR et al., 2010a; CARR et al., 2010b).

A infecção por antraz pode ocorrer de três formas (Figura 1): cutânea, gastrointestinal ou inalatória, cada uma levando a distintos sintomas e curso da doença (CARLSON JÚNIOR et al., 2010).

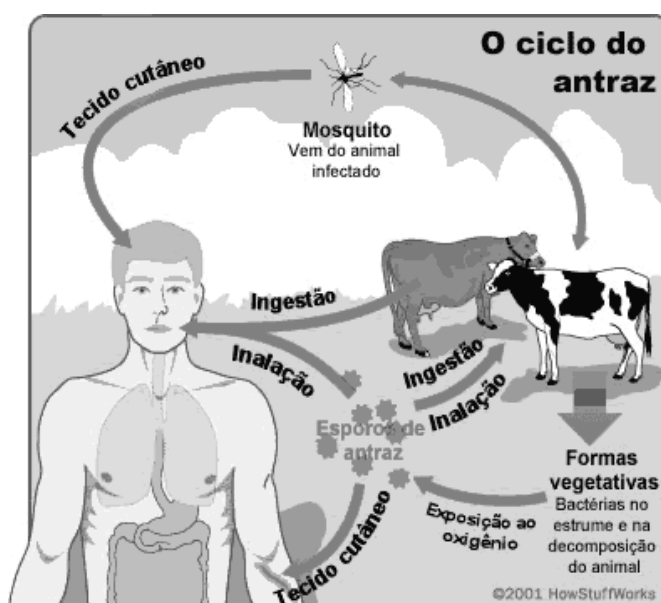


Figura 1 O ciclo do antraz. (ANTRAX, 2008)

Os esporos de *B. anthracis* podem sobreviver no solo por muitos anos e os humanos podem se contaminar por meio do manejo de animais infectados ou pela inalação de esporos a partir de produtos de animais contaminados. A disseminação pode ocorrer também por meio da carne mal cozida de animais. Os sintomas variam dependendo da forma do antraz, mas, normalmente, começam em torno de sete dias após a exposição (LINDLER; LEBEDA; KORCH, 2005). Cerca de 95% da infecção do antraz humano está na forma cutânea. O antraz

gastrintestinal e o respiratório são raros e a taxa de mortalidade dessas formas é muito maior do que a forma cutânea (MERIC et al., 2009).

Em se tratando do antraz cutâneo, a maior parte das infecções (em torno de 95%) ocorre quando a bactéria entra, através de um corte ou abrasão, na pele. A infecção na pele começa como uma mancha vermelha, que lembra uma picada de inseto, mas, por volta de 1 a 2 dias, se forma uma vesícula e, depois, uma úlcera indolor, usualmente com 1 a 3 cm de diâmetro, com uma área preta necrótica em seu centro. Glândulas linfáticas em regiões adjacentes podem inflamar. Em torno de 20% dos casos não tratados de antraz cutâneo resultam em morte (DIXON et al., 1999).

Quando a contaminação por antraz se dá por inalação, os sintomas iniciais lembram um resfriado comum e, após vários dias, podem evoluir para sérios problemas respiratórios e choque. A inalação de antraz é, normalmente, fatal. A forma gastrintestinal é caracterizada por uma inflamação aguda do trato gastrintestinal e os sinais iniciais são náusea, perda de apetite, febre seguida de dor abdominal, vômito de sangue e diarreia severa. O antraz gastrintestinal resulta em morte em 25% a 60% dos casos (DIXON et al., 1999). Tanto militares quanto terroristas já fizeram uso do *B. anthracis* para fins de guerra biológica. Esporos foram transformados em armas, pelos EUA, nas décadas de 1950 e 1960; a Inglaterra realizou experimentos com esta bactéria na ilha de Gruinard, na década de 1950 e o Iraque admitiu ter realizado pesquisas, em 1991 e 1995, visando o uso ofensivo desse microrganismo. Além disso, o *B. anthracis* foi enviado, em cartas, para membros do governo americano, logo depois dos atentados terroristas de 11 de setembro de 2001. Estima-se que um ataque em larga escala em uma grande cidade, como Nova Iorque, possa causar milhares de vítimas (LINDLER; LEBEDA; KORCH, 2005).

As terapias atualmente disponíveis são à base de ciprofloxacina, tetraciclina e penicilina (CARLSON JÚNIOR et al., 2010). A busca por novos

agentes terapêuticos contra o antraz é importante porque estratégias de vacinação atuais requerem a administração regular de reforços, ao longo de um período de 18 meses, para manter a imunidade e o tratamento profilático de antraz requer a administração de antibióticos aos pacientes, antes da manifestação dos sintomas (BENNETT et al., 2007; BENNETT et al., 2009).

Embora haja quimioterapia disponível para o tratamento do antraz atualmente, o risco de desenvolvimento de resistência contra esses fármacos está sempre presente. Além disso, é também muito provável que esses fármacos sejam ineficientes contra cepas geneticamente modificadas dessa bactéria. Dessa forma, é necessária a busca por novos fármacos, bem como novos alvos moleculares, para o desenvolvimento de fármacos contra o *B. anthracis*. Uma boa opção dentre os alvos moleculares disponíveis é a enzima di-hidrofolato redutase (DHFR).

2.2.3 Di-hidrofolato redutase

A di-hidrofolato redutase (DHFR) é estudada como um alvo terapêutico de várias doenças infecciosas (BEIERLEIN; KARRI; ANDERSON, 2010; SHARMA; CHAUHAN, 2012) e a de *Bacillus anthracis* (*Ba*DHFR) já foi investigada como um potencial alvo no tratamento do antraz (BENNETT et al., 2007; BEIERLEIN; KARRI; ANDERSON, 2010).

A DHFR desempenha papel-chave na via de biossíntese de ácido fólico, responsável pela geração da base de DNA, monofosfato desoxitimidina, bem como a biossíntese de nucleotídeos purina e os aminoácidos histidina e metionina (BEIERLEIN et al., 2008; SHARMA; CHAUHAN, 2012; NAMMALWAR et al., 2012).

Essa enzima, essencial no metabolismo celular, catalisa a redução de di-hidrofolato para formar tetra-hidrofolato, usando o cofator NADPH

(BEIERLEIN et al., 2009). O mecanismo de reação da enzima está representado na Figura 2.

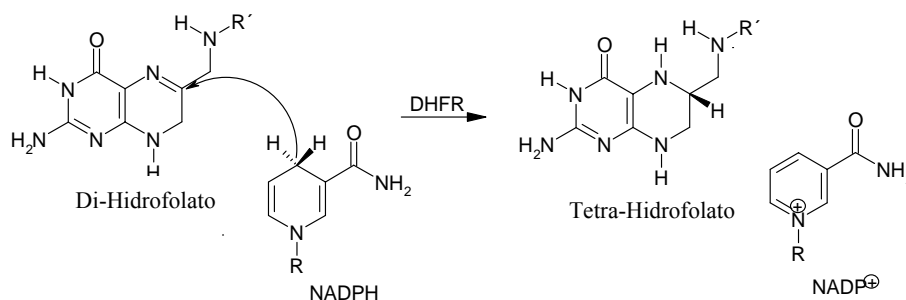


Figura 2 Reação da di-hidrofolato redutase

Sabe-se também que células humanas dependem também da DHFR para a replicação do DNA. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de inibidores que não só sejam potentes, mas também seletivos para o patógeno. Felizmente, as diferenças de sítio ativo têm permitido o desenvolvimento de inibidores específicos para algumas bactérias e alguns protozoários parasitas, incluindo *Plasmodium* e *Toxoplasma gondii* (BEIERLEIN et al., 2008).

Alguns inibidores da DHFR são utilizados em um ambiente clínico, como, por exemplo, trimetopima (TMP), um seletivo antibacteriano, e a ametopterina, ou metotrexato (MXT), um quimioterápico utilizado contra certos tipos de câncer e artrite reumatoide. No entanto, existem desvantagens no uso de cada um desses compostos contra o antraz. O *B.anthraxis* é naturalmente resistente ao TMP (Figura 3) e o MXT (Figura 4) liga-se potently à DHFR humana (*HssDHFR*), excluindo-o do uso como antibiótico (BENNETT et al., 2007; BEIERLEIN et al., 2008).

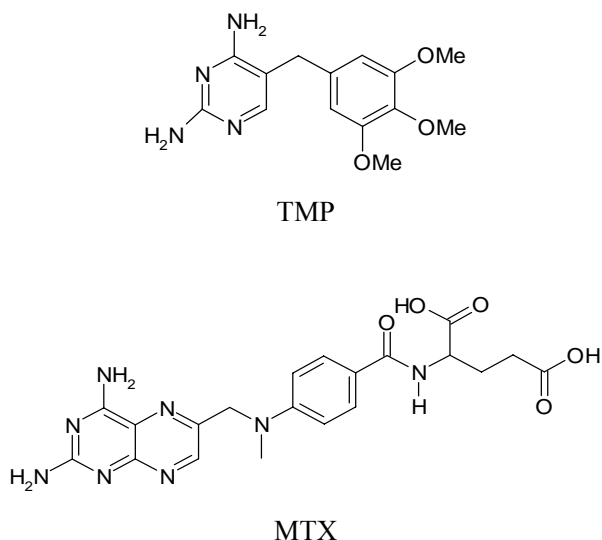


Figura 3 Estrutura dos inibidores da enzima *Ba*DHFR

Com relação ao TMP, como dito anteriormente, o *B. anthracis* apresenta uma resistência natural a esse inibidor, devido a uma falta de afinidade entre a enzima e o inibidor (JOSKA; ANDERSON, 2006; BARROW; BOURNE; BARROW, 2004; SHARMA; CHAUHAN, 2012). Seu uso clínico foi relatado em 1962 e a resistência microbiana ao TMP foi identificada em 1968 (BOURNE et al., 2009; DARRELL; GARROD; WATERWORTH, 1968).

Beirlein et al. (2008) examinaram a resistência da TMP na DHFR de *Cryptosporidium hominis* (*Ch*DHFR) e, após a análise da estrutura da *Ch*DHFR, atribuíram a resistência ao TMP à incapacidade do anel trimetoxifenil ocupar adequadamente a cavidade hidrofóbica no sítio ativo da enzima. Posteriormente, esses autores desenvolveram uma série altamente potente, eficiente e eficaz de inibidores da DHFR contra dois protozoários parasitas. Essa série é caracterizada por uma ligação propargil entre os dois arenos, proporcionando o espaçamento ideal e a rigidez para produzir inibidores potentes.

Docking com compostos à base de propargil em um modelo por homologia da *Ba*DHFR sugeriu que é possível explorar uma estratégia similar para desenvolver inibidores do *Ba*DHFR (BEIRLEIN et al., 2008).

2.3 Guerra química

A expressão "guerra química" foi utilizada pela primeira vez em 1917 (SMART, 1997; DELFINO; RIBEIRO; FIQUEROA-VILLAR, 2009). De acordo com as Convenções de Armas Biológicas e Tóxicas de 1972 e 1993, agentes de guerra química são definidos como substâncias químicas, quer gasosas, líquidas ou sólidas, que podem ser utilizadas devido aos seus efeitos tóxicos direto sobre os seres humanos, animais e plantas (SILVA et al., 2012).

A convenção define que armas químicas incluem não apenas os produtos químicos tóxicos, mas também munições e equipamentos utilizados para a sua dispersão. Produtos químicos tóxicos incluem qualquer produto químico que, por meio do seu efeito químico sobre os processos de vida, pode causar morte, perda temporária de desempenho ou lesão permanente em pessoas e animais (SADIK; LAND; WANG, 2003).

Em um contexto militar, podem-se mencionar dois objetivos básicos para o uso de armas químicas contra pessoas: causar baixas (mortos e feridos) nas tropas e diminuir o desempenho operacional das tropas inimigas, em razão da necessidade do uso prolongado de equipamentos de proteção (SILVA et al., 2012).

Devido à facilidade de manufatura e ao baixo custo, as armas químicas passaram do interesse estritamente militar para o interesse de organizações terroristas. Isso faz com que a defesa contra guerra química deixe de ser um objeto de preocupação essencialmente militar e se torne uma preocupação também do âmbito civil (SILVA et al., 2012; CASTRO, 2001).

2.3.1 Utilização de armas químicas em guerras

O uso de armas químicas se dá desde a Antiguidade, por diversos povos, porém, seu maior desenvolvimento aconteceu durante a Primeira Guerra Mundial, quando elas passaram a ser utilizadas em larga escala (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010). Na Tabela 1 são apresentados alguns fatos históricos de uso de agentes químicos em conflitos (DELFINO; RIBEIRO; FIQUEROA-VILLAR, 2009).

Tabela 1 Fatos históricos de uso de armas químicas

Data	Fatos históricos
1915-18	Uso de armas químicas na Primeira Guerra Mundial
1935	Itália usou gás mostarda na Líbia e na Etiópia
1936	O químico alemão sintetizou o agente neurotóxico tabun
1937	Schrader e colaboradores sintetizaram o agente neurotóxico sarin
1939	Japão usou gás mostarda contra a China
1942	Alemanha iniciou a produção industrial de gases de nervos em Dyhenfurth
1944	Richard Kuhn sintetizou o agente neurotóxico soman
1988	Iraque usou armas químicas na repressão contra a população curda, situada no norte do país
1994	Ataque terrorista com gás sarin em Matsumoto, Japão, executado pela seita Aum Shinrikyo, resultou em 7 mortes e mais de 300 feridos
1994/5	Tentativas de assassinato com VX ocorreram em Osaka, no Japão, por membros Aum Shinrikyo, com uma morte
1995	Aum Shinrikyo usou sarin em um ataque no metrô em Tóquio, causando 12 mortes e milhares de feridos

(DELFINO; RIBEIRO; FIQUEROA-VILLAR, 2009)

Segundo a ONU, durante a Primeira Guerra Mundial, houve quase 200 ataques químicos. No maior deles, em outubro de 1915, os alemães liberaram

550 toneladas de cloro gasoso (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 1969).

Muitos compostos tóxicos, além do cloro, foram testados. Nos últimos anos da I Guerra, o gás mostarda foi muito utilizado nos conflitos. Calcula-se que pelo menos 125.000 toneladas de gases tóxicos tenham sido empregadas, causando, segundo as informações oficiais, aproximadamente 1.300.000 baixas, das quais cerca de 100.000 foram fatais (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 1969).

Porém, pouco antes da Segunda Guerra Mundial, surgiram os agentes tabun, soman e sarin (Tabela 1), a primeira geração dos agentes dos nervos, ou neurotóxicos, muito mais letais que os gases utilizados na Primeira Guerra e capazes de matar em minutos (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010).

2.3.2 Agentes neurotóxicos

Os agentes de nervos são o grupo mais letal dentre os organofosforados (OP). Tabun, sarin, soman, ciclosarin e VX são, provavelmente, os membros mais conhecidos dessa família (Figura 4) (KUCA et al., 2007; SAINT-ANDRÉ et al., 2011; MATATAGUI et al., 2011; MATOS, 2012). Esses inibidores têm como alvo principal a enzima acetilcolinesterase (AChE) (KUCA et al., 2007; SOUKUP et al., 2010).

Em geral, como pode ser visto na Figura 4, esses agentes apresentam um átomo de fósforo quiral ligado a um grupo de saída X (como o flúor e o cianeto, por exemplo), a um radical R1 (alquila ou dialquilamino), um radical R [alquila, cicloalquila, H (somente na série V), $(CH_2)_nN^+R_3$ (quando $X=F$)], formando dupla ligação com um grupo Y (oxigênio ou raramente enxofre).

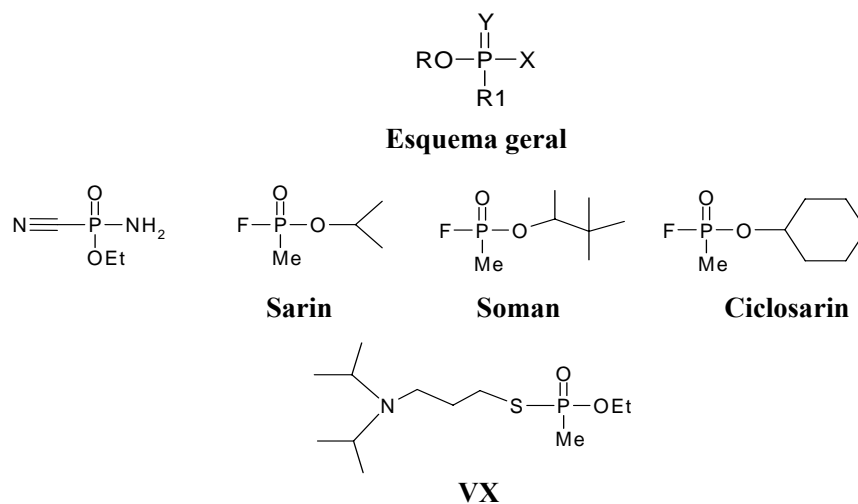


Figura 4 Estruturas de alguns agentes dos nervos

Os OP reagem diretamente com a hidroxila da serina da tríade catalítica do sítio ativo da AChE e formam um complexo relativamente estável (OP-AChE), conduzindo a efeitos tóxicos fatais (WANG et al., 2007). Esses compostos provocam um colapso no sistema nervoso central. Os sintomas são angústia, perda da coordenação e convulsões, levando à morte (MATOS, 2011).

Atualmente, o tratamento padrão contra envenenamento por OP inclui a utilização de um anticolinérgico, normalmente atropina intravenosa, para diminuir os efeitos da acumulação da acetilcolina, combinada com um depressor do sistema nervoso central, como o diazepam, para reduzir convulsões e espasmos, e uma oxima catiônica para reativar a AChE. Esses três componentes são combinados em seringas autoinjektoras que podem ser levadas para o campo de batalha (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010; SOUKUP et al., 2010; WOREK et al., 2012).

2.3.3 Acetilcolinesterase

A acetilcolina acetil-hidrolase, ou AChE, é uma enzima regulatória responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), sendo esta uma função chave na regulação da transmissão dos impulsos nervosos que, se inibida, geralmente, leva rapidamente à morte do organismo (ALBUQUERQUE et al., 2006; PATOČKA et al., 2005).

Essa enzima está presente nos sistemas nervosos central e periférico, sobre o receptor de acetilcolina e na transmissão de impulsos nervosos, por meio das sinapses neuromusculares, promovendo a destruição hidrolítica da ACh catiônica. Ela está entre as enzimas mais eficientes, sendo capaz de rapidamente hidrolisar a ACh nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas no cérebro (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; SOREQ et al., 1990).

Cada monômero da AChE contém um centro catalítico composto por dois compartimentos: o subsítio catalítico, contendo a tríade catalítica, e o subsítio aniônico, que acomoda o compartimento quaternário positivo de ACh (PATOČKA et al., 2005). Nessas regiões há quatro domínios (Figura 5), sendo que no primeiro encontram-se os resíduos de serina e histidina da tríade catalítica (Ser203 e His447), a qual é encontrada no fundo da “garganta” do sítio ativo (GONÇALVES, 2009; HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007). O segundo é o próprio subsítio aniônico, localizado a uma distância igual ou superior a 4,7 Å da hidroxila do resíduo serina, carregado negativamente, em que o grupo amônio quaternário da ACh interage, eletrostaticamente, com o Glu334 (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987). O papel do subsítio aniônico é orientar a parte carregada do substrato que entra no centro ativo (PATOČKA et al., 2005).

O terceiro domínio é constituído por uma região hidrofóbica importante para a ligação com substratos cíclicos (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987). Existe, ainda, um quarto domínio na AChE, no qual interagem ligantes catiônicos e alguns outros ligantes neutros. Esse domínio se localiza a mais de 20 Å do sítio ativo e, por isso, é denominado sítio aniônico periférico, consistindo dos resíduos de Asp74 e Trp286 como um núcleo comum.

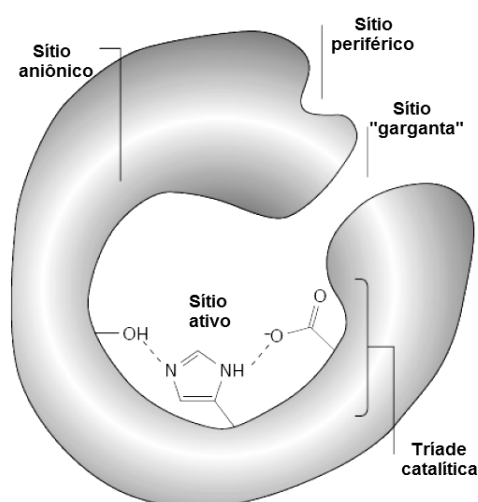


Figura 5 Sítio ativo da AChE (OBREGON, 2006; MATOS, 2012)

É importante ressaltar que a complexação de ligantes com o sítio periférico frequentemente provoca alterações na conformação do sítio ativo. As interações dos ligantes com esses resíduos podem ser a chave para a modulação alostérica da atividade catalítica da AChE (BOURNE et al., 2009; GONÇALVES, 2009; PATOČKA et al., 2005).

Devido à função chave da AChE, ela se torna um dos alvos moleculares mais vulneráveis a agentes neurotóxicos, pesticidas e venenos de cobras, e também a fármacos voltados para o tratamento das doenças, como o mal de Parkinson e o de Alzheimer (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987).

2.3.3.1 Inibição, envelhecimento e reativação da AChE

Alguns OP, por formarem um conjugado de fósforo covalentemente ligado ao resíduo Ser203, interferem no mecanismo catalítico da AChE. Esses compostos impedem a hidrólise da ACh, obstruindo a transmissão colinérgica (GONÇALVES, 2009; HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; QUINN, 1987). Na Figura 6, está representado o mecanismo de inibição da AChE por um OP.

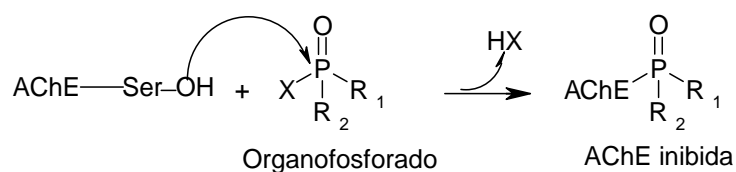


Figura 6 Esquema da inibição da AChE por OP, sendo, R₁ o grupo alquil, O-alquil ou amida; R₂ o grupo O-alquil ou amida; e X o grupo abandonador

Após a inibição da acetilcolinesterase por OP, podem acontecer dois processos: o envelhecimento ou a reativação espontânea da enzima (Figura 7), que pode ser acelerada por várias ordens de grandeza pela adição de um nucleófilo forte, como uma oxima (WOREK et al., 2005). No entanto, sem a presença de oximas, a reação de reativação para a maioria dos complexos AChE-OP ocorre a uma taxa insignificante, sendo, portanto, a reação de envelhecimento majoritária (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007).

O processo de envelhecimento ocorre por meio de uma reação de eliminação ou desalquilação espontânea do fósforo conjugado na AChE, por meio da quebra da ligação oxigênio-alquil, resultando em um complexo aniônico bastante estável AChE-OP, resistente à reação de reativação baseada em oximas

conhecidas atualmente, ou seja, uma enzima inibida irreversivelmente (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; WOREK et al., 2005).

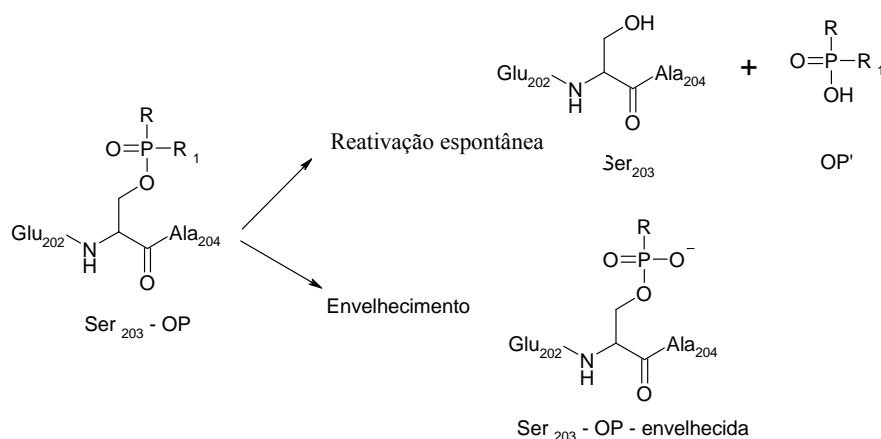


Figura 7 Esquema da reativação espontânea e do envelhecimento, sendo, R o grupo alquil, O-álquil ou amida; R1 o grupo O-álquil ou amida (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; MATOS, 2012)

A reativação da AChE se baseia na desfosforilação da Ser203. Esse é o principal mecanismo de ação das oximas. Se a oxima possui nitrogênio aromático, durante o processo de reativação, ocorre a atração da porção positivamente carregada da molécula de oxima pelo sítio aniônico da AChE, permitindo, assim, que a parte ativa da oxima se posicione sobre o sítio fosforilado da AChE e promova o ataque nucleofílico, como pode ser visto na Figura 8 (DICKOFF; GERBER; TUROVSKY, 1987; ROSMAN et al., 2009).

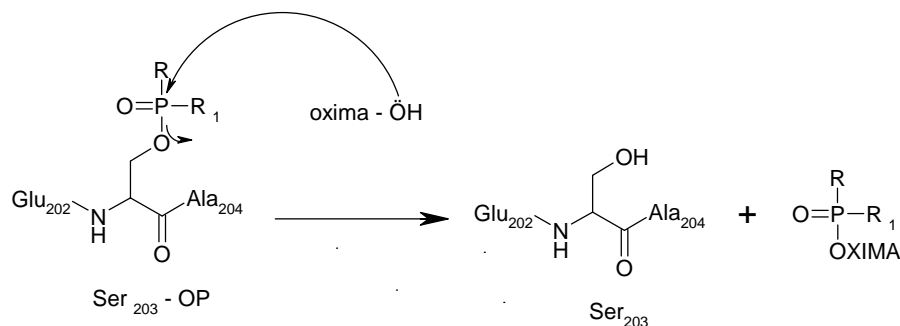


Figura 8 Reação de reativação do conjugado AChE-OP por uma oxima, sendo R o grupo alquil, O-alquil ou amida; R1 o grupo O-alquil ou amida

É importante destacar que a eficiência dessa reação de reativação depende de muitos fatores como a estrutura química dos OP e dos reativadores, bem como a sequência da enzima inibida. Os complexos formados entre a AChE e tabun, por exemplo, exibem alta resistência à reativação, enquanto os complexos formados com VX e sarin podem ser reativados por uma série de diferentes reativadores (MATOS, 2012).

2.3.4 Oximas

As oximas são compostos orgânicos que têm fórmula geral $RR'C=NOH$. Quando os grupos R e R' representam cadeias orgânicas, as oximas são classificadas como cetoximas, e quando R ou R' representam um átomo de hidrogênio, são classificadas como aldoximas (Figura 9) (CAHN; INGOLD; PRELOG, 1956).

Tratando-se de oximas pirimidimicas, suas estruturas são muito similares, diferindo uma da outra no número de anéis ou pela posição do grupo da oxima no anel pirimidímico (KASSA, et al., 2007).

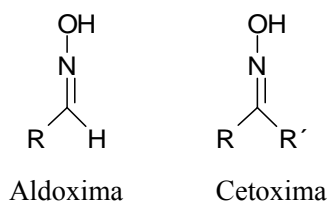


Figura 9 Estrutura química das oximas

As oximas são nucleófilos capazes de quebrar a ligação entre a AChE e o OP e libertar a enzima, que pode, em seguida, realizar o seu papel fisiológico (KUCA et al., 2007).

Cada molécula de oxima pirimidímica tem uma forte carga positiva que navega para os sítios aniônicos, carregados negativamente no sítio ativo da AChE, sendo atraída assim, para mais próximo da enzima. Em seguida, a oxima realiza o chamado ataque nucleofílico no átomo de fósforo do OP, resultando na formação do complexo instável enzima-inibidor-oxima. Como resultado, há a separação do complexo em oxima fosforilada e enzima reativada (STOJILJKOVIĆ; JOKANOVIĆ, 2006).

No século passado, várias oximas (pralidoxima, obidoxima, trimedoxima, metoxima e HI-6) foram introduzidas como antídotos contra agentes neurotóxicos. Porém, infelizmente, a sua potência para neutralizar os efeitos tóxicos agudos de alguns desses agentes é bastante limitado (KASSA et al., 2012; LAUFER et al., 2010). Dessa forma, vê-se a importância de pesquisas na busca de novas oximas que se apresentem mais eficazes contra estes e outros agentes.

2.4 Modelagem molecular

Modelagem molecular, segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e

técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT'ANNA, 2002; CARVALHO et al., 2003).

Um programa de modelagem molecular permite a representação, a visualização, a manipulação e a determinação de parâmetros geométricos (comprimento e ângulo de ligação) e eletrônicos (energia dos orbitais de fronteira, momento de dipolo, potencial de ionização, etc.) de uma molécula isolada, além de realizar estudos em macromoléculas (proteínas) e complexos droga-receptor (RODRIGUES, 2001).

A aplicação de métodos computacionais no estudo e no planejamento de compostos bioativos tem se tornado uma prática rotineira nos dias atuais. Esses métodos computacionais podem ser utilizados como ferramentas no planejamento racional de compostos bioativos, assim chamados porque é orientado por uma hipótese racional sobre os mecanismos de ação desses compostos (SANT'ANNA, 2009; BARREIRO; FRAGA, 2001).

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e o planejamento de fármacos. Essas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse (CARVALHO et al., 2003).

2.5 Mecânica molecular

Segundo Rodrigues (2001), mecânica molecular (MM) é um método que calcula a estrutura e a energia das moléculas com base nos movimentos dos núcleos.

De acordo com a MM, as moléculas são descritas como um conjunto de “átomos conectados”, em vez de núcleos e elétrons, como acontece nos métodos

quânticos. Esse modelo é justificável porque os parâmetros associados a conjuntos de átomos permanecem razoavelmente constantes entre estruturas diferentes, desde que o tipo e a hibridação dos átomos envolvidos sejam os mesmos (BURKERT; ALLINGER, 1982; SANT'ANNA, 2009).

Os movimentos dos núcleos são estudados por forças harmônicas ou elásticas, utilizando-se os princípios da física clássica (Leis de Newton), enquanto os elétrons não são explicitamente examinados, mas, assume-se que eles têm uma distribuição ótima em torno dos núcleos (FORESMAN; FRISCH, 1993; PASSAMANI, 2009).

O que se faz em MM é desenvolver o chamado campo de força, um conjunto de funções de energia que determinam penalidades energéticas para o afastamento da estrutura desses valores “normais” (BURKERT; ALLINGER, 1982; SANT'ANNA, 2009). A minimização de energia é um processo no qual,

por meio de um algoritmo matemático adequado, busca-se reduzir em conjunto

essas penalidades, ou seja, a energia, a um mínimo.

Os campos de força modernos têm dezenas de termos, incluindo termos que combinam duas ou mais funções (termos cruzados) e termos para interações eletrostáticas e de van der Waals entre átomos não ligados (SANT'ANNA, 2009).

A escolha do método de minimização de energia depende de fatores relacionados ao tamanho da molécula, à disponibilidade de parâmetros, aos dados armazenados e ao recurso computacional (CARVALHO et al., 2003).

Os modelos moleculares gerados pelo computador são resultantes de equações matemáticas que estimam as posições e as propriedades dos elétrons e

núcleos; os cálculos realizados exploram, de forma experimental, as características de uma estrutura, fornecendo uma molécula sob nova perspectiva (CARVALHO et al., 2003).

2.6 Ancoramento molecular (*docking*)

A simulação computacional do ancoramento molecular (*docking*) é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre uma proteína e um ligante, nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada (SILVEIRA, 2003), seja por cristalografia ou pela técnica computacional de modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (D'ALFONSO; TRAMONTANO, 2001; FRANÇA et al., 2008; SOUZA et al., 2008).

Os valores da função de desempenho do ancoramento E_{score} são definidos pelas Equações 1, 2 e 3.

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (1)$$

em que

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{proteína}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (2)$$

E_{inter} corresponde à energia de interação ligante-proteína. O termo E_{PLP} representa a energia potencial do inibidor por partes, que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (*van der Waals*) entre átomos e outro potencial para a ligação hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados. É um potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distância

($D(r) = 4r$). O valor numérico de 332,0 fixa as unidades de energia eletrostática para kcal mol^{-1} (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; SOUZA et al., 2008; RAMALHO et al., 2009; OGUNGBE; SETZER, 2009).

E_{intra} é a energia interna do ligante (Equação 3).

$$E_{\text{intra}} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{\text{penalizada}} \quad (3)$$

As duas primeiras somas contidas na equação estão relacionadas a todos os pares de átomos do ligante, excluindo-se os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à energia de torção, em que θ é o ângulo de torção da ligação. O último termo, $E_{\text{penalizada}}$ (chamado de termo de correção), atribui uma penalidade de 1.000, se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2,0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante. Em resumo, essas funções são utilizadas para ancorar automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde (proteína) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

A técnica de ancoramento molecular encontra uma média de estruturas estáveis do ligante na proteína e calcula essa estabilidade relativa. Para encontrar a estrutura de menor energia, sem qualquer suposição prévia, é necessário analisar todos os modos de interação, considerando a flexibilidade conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da proteína. Como esses dois problemas estão interligados, eles podem ser resolvidos ao mesmo tempo. Contudo, o número de combinações envolvidas é muito grande (MIZUTANI; TOMIOKA; ITAI, 1994).

2.7 Dinâmica molecular

A simulação de dinâmica molecular (DM) é uma das técnicas computacionais mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas (HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002; ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006).

Os cálculos de DM são fundamentados nos princípios da Mecânica Clássica e fornecem informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (BURKERT; ALLINGER, 1982; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Com base na MM, as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos que pode ser descrita por forças newtonianas, ou seja, são tratadas como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008; VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990).

Os cálculos de dinâmica molecular consistem da solução numérica, passo a passo, da equação de movimento de Newton, que pode ser descrita para um sistema atômico simples pelas Equações 4 e 5.

$$\mathbf{F}_i(t) = m_i \mathbf{a}_i \quad (4)$$

$$\mathbf{F}_i(t) = \frac{\partial V(\mathbf{r}_i)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (5)$$

em que \mathbf{F}_i representa a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo t e \mathbf{a}_i é a aceleração do átomo i de massa m_i (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Após definir o campo de forças, é possível determinar a força que atua sobre cada átomo, calculando-se a primeira derivada da energia potencial obtida do campo de forças escolhido com relação à posição dos núcleos (Equação 6) (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). Essas equações são resolvidas

simultaneamente em um pequeno espaço de tempo. Com isso, tem-se a trajetória de cada átomo do sistema com relação ao tempo.

Para se realizar um cálculo de DM, é importante especificar as posições iniciais das partículas que compõem o sistema. Geralmente, elas são situadas na posição de uma rede cristalina, para evitar sobreposições indesejáveis entre elas (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). O sistema é montado dentro de uma caixa que pode adotar diferentes geometrias, mas, geralmente, utiliza-se uma caixa cúbica. No caso de sistemas biomoleculares, são adicionadas moléculas de água dentro do sistema e, na caixa, é aplicado o modelo de condição periódica de contorno, evitando que as moléculas de água escapem do meio (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Antes de se iniciar as simulações de DM, o sistema deve ser minimizado, a fim de se evitar maus contatos entre os átomos (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). A minimização, ou otimização, do sistema é feita a fim de se obter uma energia próxima do mínimo local. Os algoritmos de minimização mais utilizados são o método do máximo declive, o método dos gradientes conjugados e o método quasi Newton Raphson.

O método do máximo declive (FRANÇA, 2004; WIBERG, 1965) é um método de primeira derivada que converge vagarosamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo de energia. De modo geral, com este algoritmo, é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente ou construir estruturas a partir de informações de RMN ou por modelagem comparativa (FRANÇA, 2004).

O método “gradientes conjugados” permite, em geral, uma convergência mais rápida que o método do máximo declive, que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada atualizada. Em se tratando da busca do mínimo da função de energia, esse método tem sido considerado o mais sofisticado, pois,

além de utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo. Este método utiliza, para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior (FRANÇA, 2004).

O método Newton-Raphson utiliza tanto as derivadas primeiras quanto as segundas derivadas da função. Assim, além de usar as informações do gradiente, utiliza a curvatura para prever onde a função mudará a direção ao longo do gradiente (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

2.8 Associação entre *docking* e dinâmica molecular

Docking e dinâmica molecular podem ser combinadas para um estudo mais confiável do complexo proteína-ligante. A força dessa associação encontra-se em seus pontos fortes e fracos complementares. De um lado, o *docking* é utilizado para explorar um vasto espaço conformacional de ligantes, permitindo o exame de grandes bibliotecas de drogas semelhantes a um custo razoável. As principais dificuldades são a falta ou a pouca flexibilidade de toda proteína e a ausência de uma função de pontuação única e amplamente aplicável (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006).

Por outro lado, simulações de dinâmica molecular podem tratar tanto ligante quanto proteína, de forma flexível, permitindo um ajuste dos receptores no sítio ativo. Além disso, pode-se estudar o efeito de água explícita. No entanto, os principais problemas com simulações de dinâmica são que os cálculos são demorados e o sistema pode ficar preso em mínimos locais.

Portanto, na combinação das duas técnicas, o *docking* é utilizado para a triagem rápida de grandes bibliotecas de drogas semelhantes e as simulações DM são, então, aplicadas para explorar conformações do receptor de proteína, otimizar as estruturas dos complexos final e calcular as

energias precisas. Assim, essa associação tem contribuído de forma mais eficaz para a melhora do processo de *design* de drogas (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006).

2.9 Os métodos híbridos-QM/MM

Devido ao grande número de átomos em proteínas e ao fato de reações envolverem a quebra e a formação de ligações químicas, a catálise enzimática é um grande desafio para a química computacional (BORMAN, 2004).

Métodos quanto-mecânicos de alto nível teórico são limitados à aplicação em sistemas com número relativamente pequeno de átomos. A combinação dos métodos quanto-mecânicos e de mecânica molecular (QM/MM) estende o domínio dos cálculos QM a macromoléculas. A estratégia básica nessa metodologia, introduzida por Warshel e Levitt (1976), pode ser descrita da seguinte forma: assume-se que o sistema molecular pode ser dividido em dois subsistemas, região QM e MM, como pode ser visto na Figura 10.

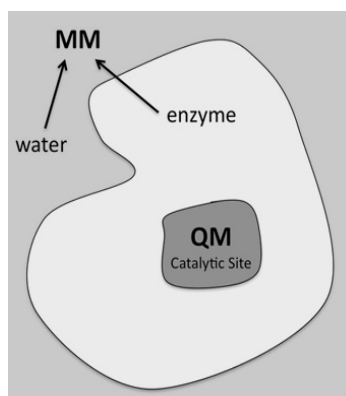


Figura 10 Esquema da abordagem híbrida mecânica quântica/mecânica molecular (QM/MM). A enzima e o solvente são tratados ao nível da teoria MM. A parte QM inclui os átomos envolvidos na reação enzimática (VIVO, 2011)

As regiões MM contêm todos os átomos que são tratados explicitamente no cálculo. Na região QM, os átomos são representados por núcleos e elétrons e a superfície de potencial é construída dentro da aproximação Born-Oppenheimer (SZABO; OSLUND, 1996).

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, E. X. et al. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 35, p. 13220-13225, May 2006.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medical Care Research and Review**, Thousand Oaks, v. 26, n. 5, p. 531-68, May 2006.

AMITAI, G. et al. Decontamination of chemical and biological warfare agents with a single multi-functional material. **Biomaterials**, Surrey, v. 31, n. 15, p. 4417-4425, 2010.

ANTRAX. **GrupoEscolar**, Rio de Janeiro, jun. 2008. Disponível em: < <http://www.grupoescolar.com/pesquisa/antrax.html> >. Acesso em: 05 dez. 2012.

ANONYMOUS, C. Bioterrorism: safeguarding the public's health. **Lancet**, British, v. 358, N. 9112, p. 1283-1283, May 2001.

ATLAS, R. A. Bioterrorism before and af ter September 11. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 27, n. 4, p. 355-379, 2001.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2001.

BARROW, E. W.; BOURNE, P. C.; BARROW, W. W. Functional cloning of *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase and confirmation of natural resistance to trimethoprim. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, n. 12, p. 4643–4649, Dec. 2004.

BEIERLEIN, J. et al. Synthetic and crystallographic studies of a new inhibitor series targeting *bacillus anthracis* dihydrofolate reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 51, n. 23, p. 7532-7540, Dec. 2008.

BEIERLEIN, J. M. et al. The solution structure of *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase yields insight into the analysis of structure-activity relationships for novel inhibitors. **Biochemistry**, Surrey, v. 48, n. 19, p. 4100-4108, 2009.

BEIERLEIN, J. M.; KARRI, N. G.; ANDERSON, A. C. Targeted mutations of *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase condense complex structure–activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 53, n. 20, p. 7327-7336, Sept. 2010.

BENNETT, B. C. et al. Crystal structure of the anthrax drug target, *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 50, n. 18, p. 4374-4381, Sept. 2007.

BENNETT, B. C. et al. X-ray structure of the ternary MTX-NADPH complex of the anthrax dihydrofolate reductase: a pharmacophore for dual-site inhibitor design. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 166, n. 2, p. 162-171, May 2009.

BORMAN, S. A. Much ado about enzyme mechanism. **Chemical and Engineering News**, Washington, v. 82, n. 8, p. 35-39, Aug. 2004.

BOURNE, C. R. et al. Crystal structure of *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase with the dihydrophthalazine-based trimethoprim derivative RAB1 provides a structural explanation of potency and selectivity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 53, n. 7, p. 3065-3073, July 2009.

BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. **Molecular mechanics**. Washington: American Chemical Society, 1982.

CAHN, R. S.; INGOLD, C. K.; PRELOG, V. The specification of asymmetric configuration in organic chemistry. **Experientia**, Basel, v. 12, p. 81-94, Oct. 1956.

CARLSON JÚNIOR, P. E. et al. Genetic analysis of petrobactin transport in *Bacillus anthracis*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 75, n. 4, p. 900-909, Apr. 2010.

CARR, K. A. et al. The role of *Bacillus anthracis* germinant receptors in germination and virulence. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 75, n. 2, p. 365-375, Feb. 2010a.

CARR, K. A.; JANES, B. K.; HANNA, P. C. Role of the gerP operon in germination and outgrowth of *Bacillus anthracis* spores. **PLoS One**, Michigan, v. 5, n. 2, p. e9128-9134, Feb. 2010b.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 428-438, maio 2003.

CASTRO, A. T. Terrorismo químico e biológico: a ameaça do século XXI. **C&T: revista militar de ciência e tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 65-73, maio/ago. 2001.

CHRISTOPHER, G. W. et al. Biological warfare: a historical perspective. **JAMA**, Chicago, v. 278, n. 5, p. 412-417, Aug. 1997.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A. Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 134, n. 2-3, p. 246-256, May/June 2001.

DARRELL, J. H.; L. P.; GARROD; WATERWORTH, P. M. Trimethoprim: laboratory and clinical studies. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 21, n. 2, p. 202–209, 1968.

DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 387-575, 2009.

DEPARTMENT OF THE ARMY FIELD MANUAL FM 8-9. **NATO handbook on the medical aspects of NBC defensive operations AMedP-6(B)**. Washing Ton: Department of The Army, 1996.

DICKOFF, D. J.; GERBER, O.; TUROVSKY, Z. Delayed neurotoxicity after ingestion of carbamate pesticide. **Neurology**, Minneapolis, v. 37, n. 7, p. 1229-1231, July 1987.

DIXON, T. C. et al. Anthrax. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 341, n. 11, p. 815-826, Sept. 1999.

FERNANDES, P. M. B. A guerra biológica através dos séculos. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 31, n. 186, p. 20-27, set. 2002.

FORESMAN, J. B.; FRISCH, A. E. **Exploring chemistry with electronic structure methods: a guide to using gaussian**. Pittsburg: Gaussian, 1993.

FRANÇA, T. C. C. et al. A questão da defesa contra agentes de guerra biológica nas Forças Armadas e no Brasil. **C&T: revista militar de ciência e tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 56-67, 2008.

FRANCA, T. C. C. **Modelagem molecular da serina hidroximetiltransferase de Plasmodium Falciparum: modelos tridimensionais e proposta de potenciais inibidores seletivos**. 2004. 232 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2004.

FRANÇA, T. C. C.; SILVA, G. R.; CASTRO, A. T. de. Defesa química: uma nova disciplina no ensino de química. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 84-104, out. 2010.

FRIEDRICH, F. The history of biological warfare. **EMBO Reports**, Oxford, v. 4, p. 47-52, June 2003. Suplemento.

FRISCHKNECHT, F. The history of biological warfare. **EMBO Reports**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 47-52, June 2003.

GONÇALVES, A. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos**. 2009. 207 f. Tese (Doutorado em Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; VAN GUNSTEREN, W. F. Molecular dynamics simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 12, p. 190-196, 2002.

HARRIS, S. H. **Factories of death: japanese biological warfare, 1932-1945, and the American cover-up**. New York: Routledge, 2002.

HARRIS, S. H. Japanese biological warfare research on humans: a case study of microbiology and ethics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 666, n. 1, p. 21-52, Dec. 1992.

HERRMANN, H. W. et al. Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ). **Physics Plasmas**, New York, v. 6, n. 5, p. 2284, Dec. 1999.

HÖRNBERG, A.; TUNEMALM, A.; EKSTRÖM, F. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with organophosphorus compounds suggest that the acyl pocket modulates the aging reaction by precluding the formation of the trigonal bipyramidal transition state. **Biochemistry**, Surrey, v. 46, n. 16, p. 4815-4825, Apr. 2007.

IRENGE, L. M.; GALA, J. L. Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 93, n. 4, p. 1411–1422, Feb. 2012.

JOSKA, T.; ANDERSON, A. C. Structure-activity relationships of bacillus cereus and *bacillus anthracis* dihydrofolate reductase: toward the identification of new potent drug leads. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 50, n. 10, p. 3435-3443, Oct. 2006.

KASSA, J. et al. The benefit of combinations of oximes for the reactivating and therapeutic efficacy of antidotal treatment of sarin poisoning in rats and mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 22, n. 4, p. 260-267, May 2012.

KASSA, J. et al. The development of new structural analogues of oximes for the antidotal treatment of poisoning by nerve agents and the comparison of their reactivating and therapeutic efficacy with currently available oximes. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 11, n. 3, p. 267-283, May 2007.

KUCA, K. et al. Potency of five structurally different acetylcholinesterase reactivators to reactivate human brain cholinesterases inhibited by cyclosarin. **Clinical Toxicology**, New York, v. 45, n. 5, p. 512-5, May 2007.

KUROSAKI, Y. et al. A simple and sensitive method for detection of *Bacillus anthracis* by loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 6, p. 1947-1956, June 2009.

LAUFER, R. et al. Synthesis, antidotal effects and HPLC behavior of some novel pyridinium aldoximes. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 14, n. 5, p. 447–456, May 2010.

LEITENBERG, M. Biological weapons in the twentieth century: a review and analysis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 27, n. 4, p. 267–320, Apr. 2001.

LEÓN-ROSALES, S. P. et al. Bioterrorismo apuntes para una agenda de lo inesperado. **Cadernos de Salud Pública de México**, Cuernavaca, v. 43, n. 6, p. 589–603, jun. 2001.

LINDLER, L. E.; LEBEDA, F. J.; KORCH, G. W. **Biological weapons defense: infectious diseases and counter bioterrorism**. New Jersey: Human Press, 2005.

LINDLER, L. E.; LEBEDA, F. J.; KORCH, G. W. **Biological weapons defense: infectious diseases and counterbioterrorism**. Totow: Human Press, 2004.

MATATAGUI, D. et al. Chemical warfare agents simulants detection with an optimized SAW sensor array. **Sensors and Actuators B: chemical**, London, v. 154, n. 2, p. 199-205, June 2011.

MATOS, K. S. **Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida por ciclosarin e carbofurano**. 2012. 148 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MATOS, K. S. et al. Molecular aspects of the reactivation process of acetylcholinesterase inhibited by cyclosarin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 10, p. 1999-2004, 2011.

MERIC, M. et al. A case of pneumonia caused by *Bacillus anthracis* secondary to gastrointestinal anthrax. **International Journal of Infectious Diseases**, Turkey, v. 13, n. 6, p. 456-458, Nov. 2009.

MIZUTANI, M. Y.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. **Journal of Molecular Biology**, Tokyo, v. 243, n. 2, p. 310-326, Oct. 1994.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NAMMALWAR, B. et al. Synthesis and biological activity of substituted 2,4-diaminopyrimidines that inhibit *Bacillus anthracis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 54, p. 387-396, Aug. 2012.

OBREGON, A. D. C. **3-Alcoxi 4-hidroxi pirrolidin-2-onas, enoilcarbamatos e 3-dialcoxi fosforiloxi trialometilados: síntese e potencial inibitório sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase**. 2006. 114 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

OGUNGBE, I. V.; SETZER, W. N. Comparative molecular docking of antitrypanosomal natural products into multiple trypanosoma brucei drug targets. **Molecules**, Huntsville, v. 14, n. 4, p. 1513-1536, Apr. 2009.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **As armas químicas e bacteriológicas (biológicas) e os efeitos de seu possível emprego: relatório do secretário-geral**. Nova York Departamento de Assuntos Políticos e do Conselho de Segurança, 1969.

OSTERHOLM, M. T. Bioterrorism: a real modern threat. In: SCHELD, W. M.; CRAIG, W. A.; HUGHES, J. M. (Ed.). **Emerging infections 5**. Washington: ASM Press, 2001. p. 213-222.

PASSAMANI, F. **Modelagem molecular e avaliação da relação estrutura-atividade acoplados a estudos físicoquímico e toxicológicos in silico de derivados heterocíclicos com atividade antiviral**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro.

PATOČKA, J. et al. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. **Journal of Applied Biomedicine**, Czech Republic, v. 3, n. 2, p. 91-99, 2005.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual. transition states **Chemical Reviews**, London, v. 87, n. 5, p. 955-979, Feb. 1987.

RAMALHO, T. C. et al. Construction and assessment of reaction models of Class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, London, v. 27, n. 2, p. 95-208, 2009.

RIEDEL, S. Biological warfare and bioterrorism: a historical review. **BUMC Proceedings**, Bethesda, v. 17, n. 4, p. 400–406, Oct. 2004.

RODRIGUES, C. R. Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 3, p. 43-49, maio 2001.

ROSMAN, Y. et al. Carbamate poisoning: treatment recommendations in the setting of a mass casualties event. **American Journal of Emergency Medicine**, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 1117-1124, Feb. 2009.

SADIK, O. A.; LAND, W. H.; WANG, J. Targeting chemical and biological warfare agents at the molecular level. **Electroanalysis**, New York, v. 15, n. 14, p. 1149–1159, Aug. 2003.

SAINT-ANDRÉ, G. et al. Design, synthesis and evaluation of new α -nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase, **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 67, n. 34, p. 6352-6361, Aug. 2011.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossary of terms in theoretical organic chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 505-512, maio 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1. n. 1, p. 49-57, 2009.

SHARMA. M.; CHAUHAN, P. M. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target for infectious diseases: opportunities and challenges. **Future Medicinal Chemistry**, Lucknow, v. 4, n. 10, p. 1335-65, June 2012.

SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. **Medical aspects of chemical and biological warfare**. Washington: Office of the Surgeon General/Walter Reed Army Medical Center, 1997.

SILVA, G. R. et al. Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 10, p. 2083-2091, 2012.

SILVEIRA, R. L. V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em eucalyptus. **Addubare**, Piracicaba, v. 2, n. 9, p. 4-7, out./dez, 2003.

SMART, J. K. History of chemical and biological warfare: an American perspective. In: SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. (Ed.). **Textbook of military medicine: medical aspects of chemical and biological warfare**. Washington: Office of The Surgeon General at TMM Publications Borden Institute, 1997. Chap. 2, p. 9-86.

SOREQ, H. et al. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. **Proceeding of National Academy Science of the United State America**, Washington, v. 87, n. 24, p. 9688-9692, Dec. 1990.

SOUKUP, O. et al. Novel acetylcholinesterase reactivator K112 and its cholinergic properties. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Washington, v. 64, n. 8, p. 541-545, Oct. 2010.

SOUZA, T. C. S. et al. Molecular modelling of Mycobacterium tuberculosis acetolactate synthase catalytic subunit. **Molecular Simulation**, Cambridge, v. 34, n. 7, p. 707-713, 2008.

STOJILJKOVIĆ, M. P.; JOKANOVIĆ, M. Pyridinium oximes: rationale for their selection as causal antidotes against organophosphate poisonings and current solutions for auto-injectors. **Arhiv za Higijenu Rada I Toksikologiju**, Zagreb, v. 57, n. 4, p. 435-443, Dec. 2006.

SZABO, A.; OSTLUND, N. S. **Modern quantum chemistry**: introduction to advanced electronic structure theory. New York: Courier Dover, 1996.

TASCHETO, A. C. **Defesa química**. Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2002. 1 Apostila.

TAYLOR, C. L.; TAYLOR JÚNIOR, L. B. **Chemical and biological warfare**. Nova Iorque: Franklin Watts, 1992.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for highaccuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315-3332, Apr. 2006.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, New York, v. 29, n. 9, p. 992–1023, Sept. 1990.

VERMA, R. P.; HANSCH, C. Combating the threat of anthrax: a quantitative structure-activity relationship approach. **Molecular Pharmaceutics**, Claremont, v. 5, n. 5, p.745-759, 2008.

VIVO, M. de. Bridging quantum mechanics and structure-based drug design. **Frontiers in Bioscience**, Genova, v. 16, n. 16, p. 1619-1633, Jan. 2011.

WANG, J. et al. Oxime-induced reactivation of sarin-inhibited ache: a theoretical mechanisms study. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 111, n. 9, p.2404-2408, Sept. 2007.

WARSHEL, A.; LEVITT, M. Theoretical studies of enzymatic reactions- dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium-ion in reaction of lysozyme. **Journal Molecular Biology**, Dordrecht, v. 103, n. 2, p. 227-245, 1976.

WIBERG, K. B. A Scheme for strain energy minimization: application to the cycloalkanes. **Journal of the American Chemical Society**, England, v. 87, n. 5, p.1070-1078, 1965.

WOREK, F. et al. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. **Toxicology**, Limerick, v. 214, n. 3, p. 182-189, 2005.

WOREK, F. et al. Kinetic interactions of a homologous series of bispyridinium monooximes (HGG oximes) with native and phosphonylated human acetylcholinesterase. **Toxicology Letters**, Oxford, v. 212, n. 1, p.29-32, July 2012.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1****MOLECULAR MODELING TOWARD SELECTIVE INHIBITORS OF
DIHYDROFOLATE REDUCTASE FROM THE BIOLOGICAL
WARFARE AGENT *Bacillus anthracis***

Juliana de O. S. Giacoppo¹, Daiana T. Mancini¹, Ana Paula Guimarães², Arlan
S. Goncalves³, Elaine F. F. da Cunha¹, Tanos C. C. França², Teodorico C.
Ramalho¹

¹Laboratory of Computational Chemistry, Department of Chemistry, UFLA, PO Box
3037, 37200-000, Lavras/MG – Brazil.

²Laboratory of Molecular Modeling Applied to the Chemical and Biological Defense,
Military Institute of Engineering, Praça General Tiburcio 80, Urca, 22290-270, Rio de
Janeiro/RJ – Brazil.

³Federal Institute of Education Science and Technology of Espírito Santo (IFES),
Avenida Ministro Salgado Filho, S/Nº, 29106-010, Vila Velha/ES – Brazil.

Versão preliminar para Periódico científico: PLOS Computational Biology

1 ABSTRACT

In the present work, we applied docking and molecular dynamics techniques to study 11 inhibitors inside the enzymes dihydrofolate reductase (DHFR) from the biological warfare agent *Bacillus anthracis* (*Ba*DHFR) and *Homo sapiens sapiens* (*Hss*DHFR). Our results corroborated with experimental data and allowed the proposition of a new molecule with potential activity and better selectivity for *Ba*DHFR.

1.1 Author Summary

After the terrorist attacks against USA government's employees in 2001, *Bacillus anthracis* has emerged as a serious menace to humanity. This biological agent produces highly resistant spores and can infect human beings in different ways, causing anthrax. The vaccine available today against this disease requires several doses to be effective and the chemotherapy only works well if administrated before the appearance of the symptoms. These facts illustrate humanity's fragility face the menace represented by anthrax and call attention for the need of developing more effective ways of prevention and treatment. In the present paper we present a contribution to mitigate this problem by using molecular modeling techniques to propose the structure of a new potential drug against anthrax.

RESUMO

No presente trabalho, aplicaram-se técnicas de ancoramento molecular e de dinâmica molecular para estudar onze inibidores das enzimas di-hidrofolato redutase (DHFR) do agente de guerra biológica *Bacillus anthracis* (*Ba*DHFR) e *Homo sapiens sapiens* (*Hss*DHFR). Os resultados corroboram os dados experimentais, permitindo a proposição de uma nova molécula com potencial atividade e melhor seletividade para *Ba*DHFR.

Resumo do autor

Após os ataques terroristas contra funcionários do governo dos EUA, em 2001, *Bacillus anthracis* emergiu como uma séria ameaça para a humanidade. Este agente biológico produz esporos altamente resistentes e podem infectar os seres humanos em diferentes formas, causando o antraz. A vacina disponível, hoje, contra esta doença requer várias doses para ser eficaz e a quimioterapia só funciona bem se for administrada antes do aparecimento dos sintomas. Esses fatos ilustram a fragilidade da humanidade diante da ameaça representada por antraz e chamam a atenção para a necessidade do desenvolvimento de formas mais eficazes de prevenção e tratamento. No presente trabalho, apresenta-se uma contribuição para reduzir esse problema, utilizando-se técnicas de modelagem molecular para propor uma estrutura de um novo fármaco potencial contra o antraz.

2 INTRODUCTION

Bacillus anthracis, one of the most dangerous biological warfare agents, has already been employed as a weapon by both military and terrorist groups and is capable of causing high mortality rates, despite the therapy available today [1,2,3]. This microorganism is a gram-positive, aerobic, spore-forming bacterium that causes anthrax mainly in herbivorous animals but can also cause acute disease in humans [3,4,5,6]. *B. anthracis* exists in two morphologically distinct forms: the dormant spore (infectious form) and the metabolically active bacterium [7,8]. The spores are highly resistant and can withstand the intense stress generated by nature, persisting in the environment for long periods of time [9,10]. The spores can enter mammals hosts by three different ways (cutaneous, gastrointestinal and inhalation) each causing infection with specific symptoms [6]. The cutaneous infection occurs in about 95% of cases and the gastrointestinal and inhalation infections have higher mortality rates [11].

Current therapies against anthrax include penicillin, ciprofloxacin and tetracyclines [12]. However, prophylactic treatment requires these antibiotics being administered to patients before the onset of symptoms and the current vaccination strategies require the regular administration of reinforcements over a period of 18 months in order to maintain immunity [13,14]. This facts, together with the menace represented by the eventual use of *B. anthracis* as a biological agent, signal to the importance of the search for new targets to the drug design against anthrax.

The enzyme DHFR plays a key role in the folate pathway, responsible for the biosynthesis of deoxythymidine monophosphate, as well as of purine nucleotides and the amino acids histidine and methionine [15,16,17]. This enzyme catalyzes the reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate using

NADPH as cofactor [18] and is essential for the survival of most living beings. DHFR is an important target largely studied in literature for several human diseases (protozoal, bacterial and fungal infections, psoriasis, autoimmune disease and neoplastic diseases) [16,19] and the DHFR from *B. anthracis* (*Ba*DHFR) has been seen as a suitable target to the drug design against anthrax. Studies by Beirlein et al. [15,20] show that *B. anthracis* is resistant to clinically used antifolate trimethoprim (TMP). In order to solve this problem Beirlein et al. [15] and Pelphrey et al. [21] synthesized and tested a new set of derivatives from propargyl in order to find new effective antifolates against anthrax [15]. These compounds presented IC₅₀ values between 0.80 to 30.50 μM, but low selectivity face to human DHFR (*Hss*DHFR).

In this work we used docking and molecular dynamics (MD) techniques to study the binding modes of the inhibitors proposed by Beirlein et al. [15] and Pelphrey et al. [21] inside the active sites of *Ba*DHFR and *Hss*DHFR in order to investigate the molecular aspects essentials for the selectivity and propose new derivatives of these compounds potentially more selective to *Ba*DHFR.

2 METHODOLOGY

3.1 DHFR inhibitors studied

The structures of the inhibitors studied and their IC₅₀ values with *Ba*DHFR and *Hss*DHFR are shown in Figure 1 and Table 1, respectively. Inhibitors 1-4 and 8 were synthesized by Beirlein et al. [15] and the inhibitors 5-7 and 9-11 were synthesized by Pelphrey et al. [21].

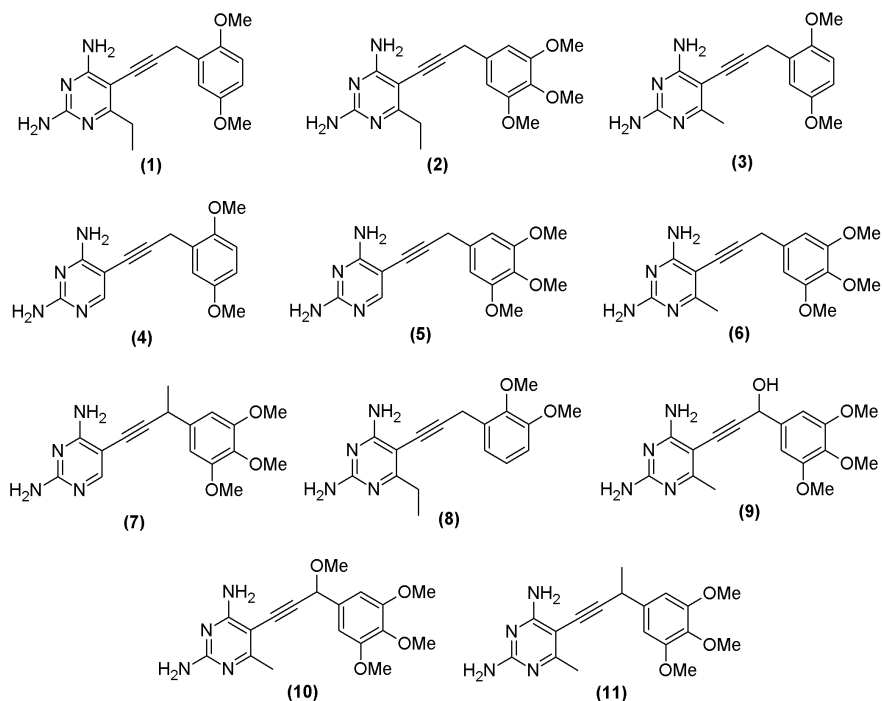


Figure 1 Inhibitors studied. Structures of the DHFR inhibitors

- (1) 5-[3-(2,5-dimethoxyphenyl)prop-1-yn-1-yl]-6-ethylpyrimidine-2,4-diamine
- (2) 2,4-Diamino-5-[3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-1-ynyl]-6-ethylpyrimidine
- (3) 2,4-Diamino-5-[3-(2,5-dimethoxyphenyl)prop-1-ynyl]-6-methylpyrimidine
- (4) 2,4-Diamino-5-[3-(2,5-dimethoxyphenyl)prop-1-ynyl]pyrimidine
- (5) 2,4-Diamino-5-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-1-ynyl)pyrimidine
- (6) 2,4-Diamino-5-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-1-ynyl)-6-methylpyrimidine
- (7) 2,4-Diamino-5-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)but-1-ynyl)pyrimidine
- (8) 2,4-Diamino-5-[3-(2,3-dimethoxyphenyl)prop-1-ynyl]-6-ethylpyrimidine
- (9) 3-(2,4-Diamino-6-methylpyrimidin-5-yl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-yn-1-ol
- (10) 2,4-Diamino-5-(3-methoxy-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-1-ynyl)-6-methylpyrimidine
- (11) 2,4-Diamino-5-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)but-1-ynyl)-6-methylpyrimidine

Table 1 IC₅₀ (μM) values of the DHFR inhibitors

Compound	<i>Ba</i>DHFR	<i>Hss</i>DHFR
1	0.89	1.28
2	0.94	0.06
3	1.30	1.30
4	1.70	3.20
5	2.30	1.46
6	3.70	0.40
7	4.80	1.46
8	9.20	0.13
9	14.50	5.71
10	29.10	1.22
11	30.30	1.38

3.2 Docking strategy

The 3D structures of the dimeric crystallographic structures *Ba*DHFR (complexed with NADPH and 5-[3-(2,5-dimethoxyphenyl)prop-1-yn-1-yl]-6-ethylpyrimidine-2,4-diamine) and *Hss*DHFR (complexed with NADPH and TMP) were downloaded from the Protein Data Bank (PDB) server [22] under the codes 3E0B and 3W3A, respectively. Considering that the monomers are identical and independent of each other, we selected only the monomer A of each enzyme to perform our docking and MD studies [23]. Also, the co-crystallized water molecules were removed from both monomers using the software Molegro Virtual Docker (MVD®) [24].

The 3D structures of each compound in Figure 1 were built using the program PC Spartan Pro® [25] and their partial atomic charges calculated by the AM1 semi-empirical method. The compounds were docked inside *Ba*DHFR and *Hss*DHFR using MVD® [24] under a restriction sphere of radius 7Å and considering the side chains of the residues within a radius of 11Å as flexible.

The binding modes of the ligands were determined as the lowest interaction energies of the enzyme–ligand complexes most associated with the bioactive conformations of 5-[3-(2,5-dimethoxyphenyl)prop-1-yn-1-yl]-6-ethylpyrimidine-2,4-diamine inside *Ba*DHFR and TMP inside *Hss*DHFR.

Due to the stochastic nature of the docking algorithm, about 15 runs were performed for each compound and 30 poses (conformation and orientation of the ligand) were returned to the analysis of the overlap with the inhibitors present in the 3D structures of the enzymes studied and the ligand–enzyme interactions. The best pose of each compound was selected for the subsequent MD simulation steps.

3.3 Molecular Dynamics studies

Before performing the MD simulations it was necessary to parameterize the ligands so they could be recognized by the forcefield OPLS/AA [26] from the program GROMACS 4.0 [27]. To obtain the parameters and topologies for the referred compounds, we used the AnteChamber PYthon Parcer Interface (ACPYPE) [28]. It is a tool based on PyThon programming language to use ANTECHAMBER (currently bundled in AmberTools version 1.4) [29] to generate parameters and topologies for chemical compounds and to interface with other Python applications like CCPN tools [30] or ARIA2 [31]. ACPYPE is currently able to generate output files for the following MM softwares: CNS/XPLOR [32,33] GROMACS [27], CHARMM [34] and AMBER [35]. The software MKTOP [36] was used to generate the parameters that were not given by ACPYPE [28]. OPLS/AA [26] forcefield parameters for the ligands were used and the atomic partial charges were calculated by semi-empirical quantum chemistry SQM [37] via ANTECHAMBER according to AM1-BCC parameters (parameterized to reproduce HF/6-31G RESP charges). SQM was modified to

include six decimals of precision instead of the default 3. The enzyme/ligands/NADPH complexes were simulated using the GROMACS 4.0 package [27] in cubic boxes of approximately 364,885 nm³ containing around 10,600 water molecules. These systems were minimized using the OPLS/AA [26] forcefield. The minimization algorithms used were steepest descent with position restrained (PR) of the ligands and convergence criterion of 100.00 kcal mol⁻¹Å⁻¹, followed by steepest descent without PR, conjugate gradients and finally, quasi Newton Raphson until an energy of 1.00 kcal mol⁻¹Å⁻¹. The minimized complexes were, then, submitted to MD simulations in two steps. Initially, we performed 500 ps of MD, at 310K and physiologic pH, with PR, at NVT state, for the entire system, except the water molecules, in order to ensure a balance of the solvent molecules around the residues of the protein. Subsequently, there were performed 10 ns of MD simulations, at NPT state, 310K and physiologic pH, without any restriction, using 2fs of integration time and a cut-off of 10Å for long-distance interactions. A total of 500 conformations were obtained during each simulation. In this step, the lists of pairs (pairlists) were updated every 500 steps and all Arg and Lys residues were assigned with positive charges and the residues Glu and Asp were assigned with negative charges, in order to reproduce their protonation states under physiologic conditions.

To analyze the structures generated after the optimization and MD steps, we used the visual molecular dynamics (VMD) [38] and Swiss-Pdb Viewer [39] programs. Plots of variation of total energy, distance, variation of random mean square deviation (RMSD) and H-bonds formed during the MD simulation were generated with the Origin program [40]. Qualitative spatial RMSD pictures were generated in the MolMol [41] and the figures of the frames of MD simulations were generated in the PyMOL program [42].

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Docking study

Figure 2 shows the re-docking results for the best-docked structures of 5-[3-(2,5-dimethoxyphenyl)prop-1-yn-1-yl]-6-ethylpyrimidine-2,4-diamine and TMP inside *Ba*DHFR and *Hss*DHFR. The RMSD for the superpositions of the non-hydrogen atoms were 0.814Å for *Ba*DHFR and 1.020Å for *Hss*DHFR, respectively. Considering that literature reports a RMSD value lower than 2.00Å as acceptable [43,44,45] these results validate the docking protocol used.

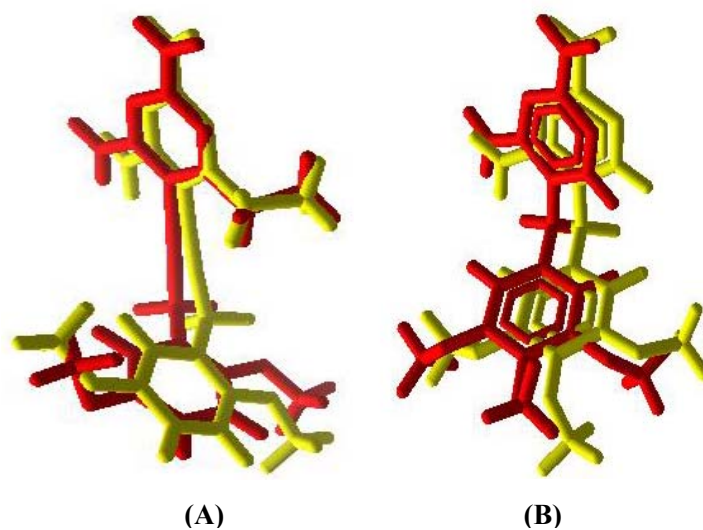


Figure 2 Validation of the docking. Re-docking of 5-[3-(2,5-dimethoxyphenyl)prop-1-yn-1-yl]-6-ethylpyrimidine-2,4-diamine (Compound 1) inside *Ba*DHFR (A) and TMP inside *Hss*DHFR (B)

The volumes of the active site cavities of *Ba*DHFR and *Hss*DHFR, calculated by MVD[®] [24], were of 295.4 Å³ and 473.1 Å³, respectively. The ligand–enzyme interaction energies were calculated inside these cavities in order

to provide a better understanding of the relationships between the binding modes of the ligands and the molecular factors responsible for activity.

Tables 2 and 3 list the docking energy values obtained in our work and the pIC_{50} values reported by Beirlein et al. [15] and Pelphrey et al. [21] for each compound inside *Ba*DHFR and *Hss*DHFR. As can be seen, the higher the pIC_{50} the lower the intermolecular energy. This is in full agreement with the experimental results reported by Beirlein et al. [15] and Pelphrey et al. [21] as illustrated by the good correlations ($R^2=0.925$ and 0.904 respectively) in the plots of Figures 3 and 4.

Table 2 Docking results and pIC_{50} ($pIC_{50} = -\log IC_{50}(\mu M)$) values for inhibitors 1 – 11 inside *Ba*DHFR

Compound	pIC_{50}	Intermolecular energy (kcal mol⁻¹)
1	6.05	-144.05
2	6.03	-136.85
3	5.89	-132.82
4	5.77	-126.30
5	5.64	-124.63
6	5.43	-121.80
7	5.32	-120.27
8	5.04	-116.54
9	4.84	-112.09
10	4.54	-108.60
11	4.52	-106.27

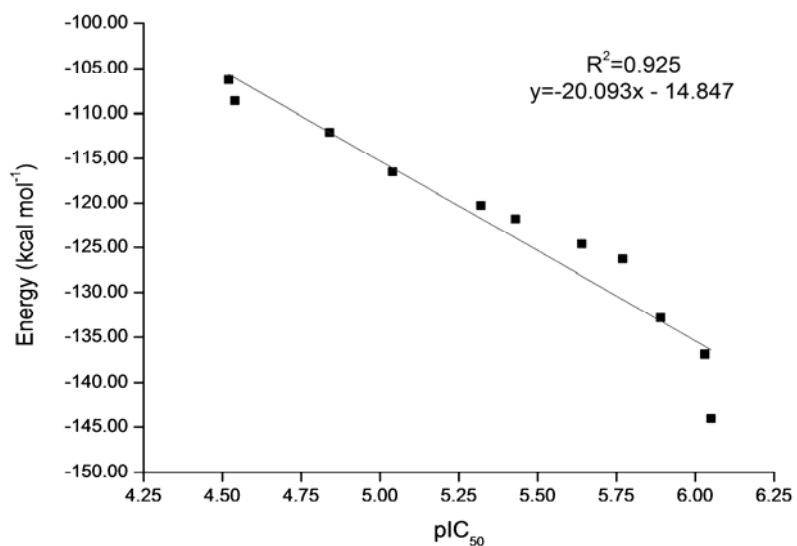


Figure 3 Experimental results *versus* theoretical results. Correlation between the intermolecular interaction energies (kcal mol⁻¹) and pIC₅₀ (μM) for inhibitors 1–11 inside *Ba*DHFR [15]

Table 3 Docking results and pIC₅₀ (pIC₅₀ = -logIC₅₀(μM)) values for inhibitors 1 – 11 inside *Hss*DHFR

Compound	pIC ₅₀	Intermolecular energy (kcal mol ⁻¹)
2	7.24	-155.87
8	6.89	-150.98
6	6.40	-144.57
10	5.91	-139.91
1	5.89	-138.48
3	5.89	-138.40
11	5.86	-138.38
5	5.84	-136.80
7	5.84	-135.51
4	5.49	-124.76
9	5.24	-118.44

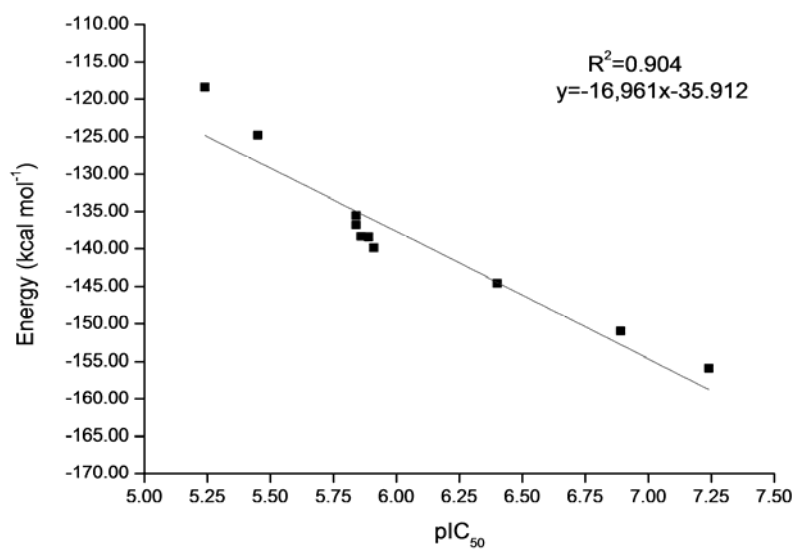


Figure 4 Experimental results *versus* theoretical results. Correlation between the intermolecular interaction energies (kcal mol⁻¹) and pIC₅₀ (μM) for inhibitors 1 – 11 inside *HssDHFR* [15]

Tables 4 and 5 list the residues present in interactions, the energies and pIC₅₀ values of the most selective inhibitors towards *BaDHFR*, according to the results shown in Tables 2 and 3. These Tables present only the results of four inhibitors selected using the criteria of selectivity which is evaluated by the experimental IC₅₀ values (Table 1).

Table 4 Docking results for inhibitors 1, 3, 4 and 11 inside *Ba*DHFR and their pIC₅₀ values

Comp	Residue	Distance (Å)	Bond strength (kcal mol ⁻¹)	ΔE* (kcal mol ⁻¹)	H-bond energy (kcal mol ⁻¹)	pIC ₅₀
1**	Met6	2.65	-1.34	-144.05	-8.64	6.05
	Thr115	3.22	-1.88			
	Glu28	2.97	-1.98			
	Glu28	2.70	-2.50			
3	Glu28	3.23	-1.84	-132.82	-8.77	5.89
	Met6	2.58	-2.32			
	Phe96	3.13	-2.34			
	Tyr102	3.15	-2.26			
	Cofactor	3.12	-2.39			
	Cofactor	2.23	-1.85			
4	Glu28	3.23	-1.87	-126.30	-8.09	5.77
	Phe96	3.13	-2.36			
	Tyr102	3.33	-1.36			
	Met6	2.72	-2.50			
	Cofactor	3.32	-1.40			
	Cofactor	2.93	-2.50			
11	Glu28	3.43	-0.86	-106.27	-3.36	4.52
	Thr115	2.97	-2.50			
	Cofactor	3.59	-0.07			

*ΔE=Intermolecular energy

**Re-docking

As can be seen in Table 4, inhibitor **1** presents the lowest energy of interaction (-144.05 kcal mol⁻¹) which could mean potential better interactions with the active site of *Ba*DHFR and, therefore, higher inhibition. This inhibitor interacts by H-bonds with three amino acid residues of the active site of *Ba*DHFR: Met06, Glu28 and Thr115 (Figure 5).

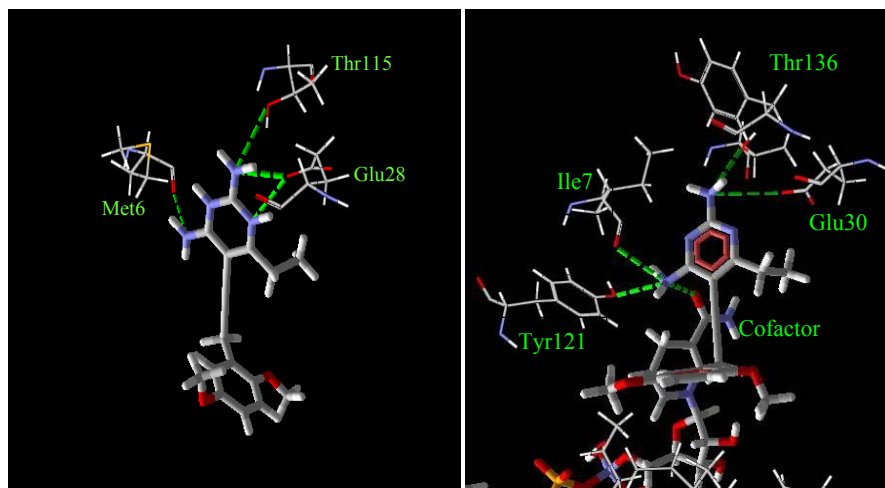


Figure 5 Hydrogen interactions. Molecular interactions of inhibitor 1 inside *Ba*DHFR (left) and *Hss*DHFR (right)

Inhibitor **11** presents a worse interaction energy value than the others ($-106.27 \text{ kcal mol}^{-1}$), showing less interactions with the active site of *Ba*DHFR, thus a low inhibitory potential. This result is in agreement with the experimental values. This inhibitor presents three H-bond interactions, one with NADPH, and the others with residues Glu28 and Thr115.

Table 5 Docking results for inhibitors 1, 3, 4 and 11 inside *Hss*DHFR and their pIC₅₀ values

Comp	Residue	Distance (Å)	Bond strength (kcal mol ⁻¹)	ΔE* (kcal mol ⁻¹)	H-bond energy (kcal mol ⁻¹)	pIC ₅₀
1	Ile7	2.99	-2.50	-138.48	-7.06	5.89
	Glu30	3.46	-0.82			
	Tyr121	3.24	-1.82			
	Thr136	3.22	-1.92			
	Cofactor	2.62	-2.50			
3	Ile7	2.75	-2.50	-138.40	-8.17	5.89
	Ala9	3.49	-0.01			
	Glu30	3.44	-0.78			
	Tyr121	3.12	-2.41			
	Thr136	3.10	-2.47			
	Cofactor	3.02	-2.50			
4	Ile7	2.75	-2.50	-124.76	-5.78	5.49
	Tyr121	3.13	-2.33			
	Thr136	3.41	-0.95			
	Cofactor	3.01	-2.50			
11	Ile7	3.33	-1.33	-138.38	-3.87	5.86
	Ala9	3.30	-0.03			
	Tyr121	3.50	-0.50			
	Thr136	3.20	-2.01			
	Cofactor	2.75	-2.50			

*ΔE=Intermolecular energy

For *Hss*DHFR, we noticed that the interaction energy value of inhibitor **1** increases to -138.48 kcal mol⁻¹, revealing H-bond interactions with Ile7, Glu30, Tyr121, Thr136 e NADPH (Figure 5). Aiming selectivity this energy difference becomes a favorable point for further study of these interactions and the

structure of this compound, subsequently, enabling a proposal of a new possible inhibitor.

Similarly, inhibitor 4 shows a variation in the interaction energy, from -126.30 kcal mol⁻¹ to -124.76 kcal mol⁻¹. Molecular interactions were observed with the cofactor and residues Ile7, Tyr121, Thr136 and NADPH. This inhibitor was also examined more carefully as a lead for new inhibitors.

Inhibitor **3** presents interaction energies of -132.82 and -138.40 kcal mol⁻¹ with *Ba*DHFR (Table 4) and *Hss*DHFR (Table 5) respectively. This small difference in terms of interaction energy is in very good agreement with experimental data.

Inhibitor **11**, as expected, presents a decrease in the interaction energy (Table 5). Residues Ile7, Ala9, Tyr121, Thr136 and NADPH are responsible for its stability and higher affinity for the active site of *Hss*DHFR.

4.2 Molecular dynamics simulations

After docking studies, all the **11** inhibitors were subjected to MD simulations in order to observe their dynamic behavior inside *Ba*DHFR and *Hss*DHFR and compare to the docking results, obtaining additional information to support the proposition of new potential inhibitors of DHFR.

The RMSD analysis can give an idea of how much the three-dimensional structure has fluctuated over time as well as allow monitoring local fluctuations, for example, the residues with increased mobility during the MD simulation. The temporal RMSD calculations were performed on all the atoms of each complex studied to 500 frames at every 10 ps, during the 10 ns of simulation. Considering that the complexes could fluctuate in the box, each frame was adjusted by the least squares method to its previous one for the calculation of the standard deviation. As observed for the system

*Ba*DHFR/Inhibitor **1** the temporal RMSD (Figures 6) tends to stabilize along the simulation. This behavior was common to all simulations, with deviations never exceeding 3.3 Å and 2.2 Å for enzyme and ligand, respectively. These results suggest that the ligands accommodated well inside the active sites during the MD simulation, showing stabilization of the systems.

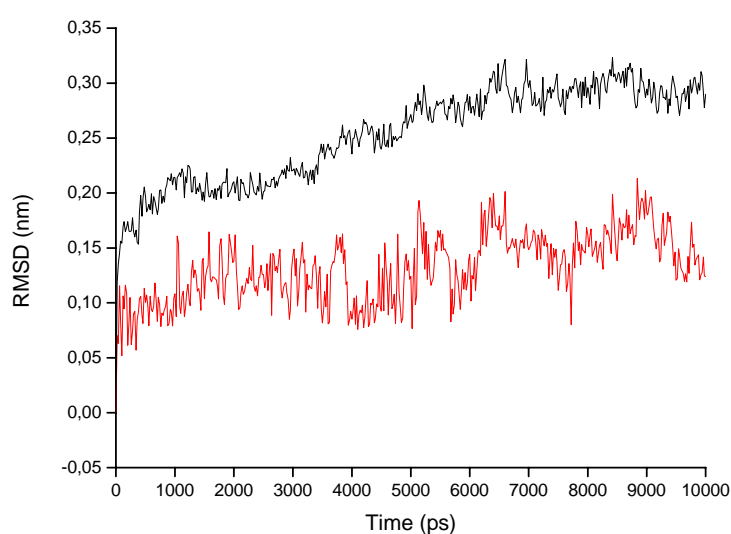


Figure 6 Temporal RMSD of the system *Ba*DHFR/Inhibitor **1** during MD simulation. The enzyme curve is shown in black and the inhibitor curve is shown in red

The sequence of frames from the MD simulation of Inhibitor **1** inside *Ba*DHFR, presented in Figure 7, shows that this inhibitor remains stabilized inside the active site, where it interacts with residues Met06, Glu28 and Thr115. This result confirms the stability of the MD simulation and the strong interaction with the enzyme, suggested by the total energy (data not shown) and RMSD plots. Similar results were observed in the docking studies, suggesting the greater stability of this molecule inside *Ba*DHFR. This stability can be an

important factor to explain its better inhibitory power observed experimentally [15].

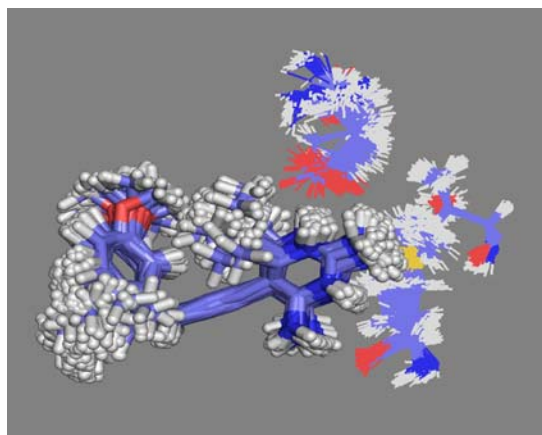


Figure 7 Dynamic frames. Inhibitor 1 inside the active site of *Ba*DHFR during the MD simulation. The cofactor was omitted for better visualization

According to the docking studies, Inhibitor **1** is able to form hydrogen bond interactions with three residues of the active site of *Ba*DHFR. Similar result was obtained in the MD simulation showing the formation of up to 6 H-bonds with the permanence of 1–3 (Figure 8).

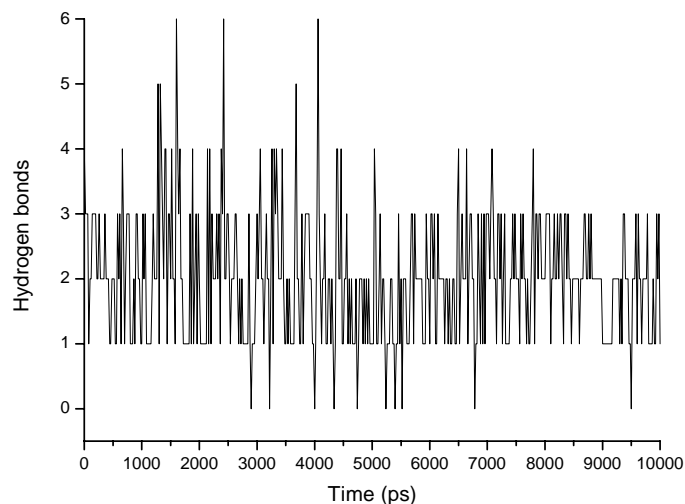


Figure 8 Number of H-bonds. Interactions between inhibitor 1 and *Ba*DHFR during the MD simulation

4.3 Proposal for prototype inhibitor

Considering selectivity we observed that inhibitors **1** and **4** presented promising results, both experimentally and theoretically, suggesting to be the most selective for *Ba*DHFR. Thus, the structures of these compounds were analyzed more carefully as leads to developing a more selective inhibitor for *Ba*DHFR.

It is worth mentioning that all studied inhibitors are structurally very similar, so any change in the position of atoms or replacement of more or less bulky groups in their structure, influences the conformation in the active site of the enzyme, and, consequently, the activity.

Based on this and analyzing the structures of inhibitors **1**, **3** and **4** (Table 1) it is noticeable that the only difference among them is at the position of group R_1 (See positions in Figure 9). While in inhibitor **1** R_1 is an ethyl group, in **3** it is a methyl and in **4** it is replaced by hydrogen. We noticed that bulkier

substituents lead to lower IC₅₀ values in both enzymes, fact that does not favor selectivity. So we also analyzed the structures of inhibitors **6**, **9**, **10** and **11** (see Table 1), which differ only in the position of group R₂, and observed that by replacing the OMe group (inhibitor **10**) by OH (inhibitor **9**) the IC₅₀ value for *Ba*DHFR decreased while increased for *Hss*DHFR. Thus, we selected the OH group as one of groups to be replaced. Another group chosen was NH₂, which has been tested with the intention of evaluating the electronic effect.

Based on these analyses were modified structures of these inhibitors at positions R₁ and R₂ as shown in Figure 9.

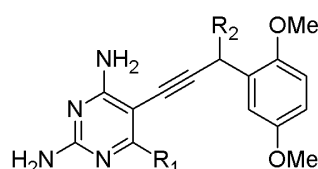


Figura 9 Proposal structure. Structure to be modified at positions R₁ and R₂

Table 6 presents the modifications performed and the interaction energy values obtained by docking studies after changes made in the structures of inhibitors **1** and **4**.

Table 6 Modifications performed and estimated values of intermolecular energy (kcal mol⁻¹) used for evaluation of the best binding modes

Inhibitor	Modification	<i>Ba</i> DHFR	<i>Hss</i> DHFR	(I.E. <i>Hss</i>)-(I.E. <i>Ba</i>)* (kcal mol ⁻¹)
		Int.energy (kcal mol ⁻¹)	Int.energy (kcal mol ⁻¹)	
1	-	-144.05	-138.48	5.57
12**	R ₂ =OH	-156.28	-136.53	19.75
4	-	-126.30	-124.76	1.54
13**	R ₁ =CH ₃ e R ₂ =OH	-140.73	-123.43	17.30

* I.E.*Hss*: Intermolecular energy (*Hss*DHFR); I.E.*Ba*: Intermolecular energy (*Ba*DHFR)

** Compounds modified

With the structural change in the inhibitor **4**, the intermolecular interaction energy between the prototype inhibitor and the enzyme *Ba*DHFR decreased. Already with the results in *Hss*DHFR no significant differences, but it can be inferred that there was a modification to increase the stability of the inhibitor in the active site of the bacterium, which favors the issue of selectivity. Furthermore, for inhibitor **13** the difference between the values of interaction energy of the inhibitors inside *Ba*DHFR and *Hss*DHFR increased from 1.54 to 17.30 kcal mol⁻¹.

Similarly, there was a significant difference in energy values between inhibitors **12** and **1**. Ongoing from -144.05 kcal mol⁻¹ to -156.28 kcal mol⁻¹ in the interaction energy in the active site of *Ba*DHFR and -138.48 kcal mol⁻¹ to -136.53 kcal mol⁻¹ in the interaction energy with residues of *Hss*DHFR. Thus, resulting in a difference of 19.75 kcal mol⁻¹ between the values of interaction energy of the inhibitors in active sites of *Ba*DHFR and *Hss*DHFR. With these changes were not observed large variation in the stability of the compounds formed in the active site of the human enzyme, but in relation to *Ba*DHFR a significant increase in the stability of these compounds. Based on these results we selected inhibitor **12** as a prototype for more detailed study.

Docking studies reveal that this compound carries seven interactions which favor its stability. In addition to the interactions observed for inhibitor **1** (Figure 4), prototype **12** also presents interactions with NADPH, Asn47 and Tyr102 (Figure 10). Inside *Hss*DHFR, we observed the same interactions views on **1** except interaction with the residue Glu30 (Figure 10). The insertion of the -OH group resulted in no new interaction as evidenced in small variation of the interaction energy presented in Table 6.

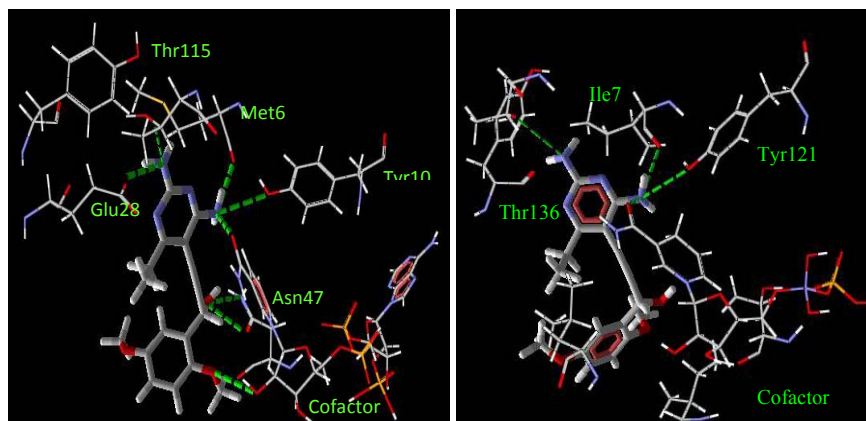


Figure 10 Hydrogen interactions. Molecular interactions between prototype 12 and *Ba*DHFR (left) and *Hss*DHFR (right).

Figure 11 shows the succession of frames of MD for inhibitor **12** inside *Ba*DHFR. As can be seen in the simulation the inhibitor remained in the active site. This fact confirms the good interaction with the enzyme, corroborating the docking results. The RMSD results for *Ba*DHFR were the same as shown for inhibitor 1, confirming the stability of this prototype inside *Ba*DHFR during the simulated time.

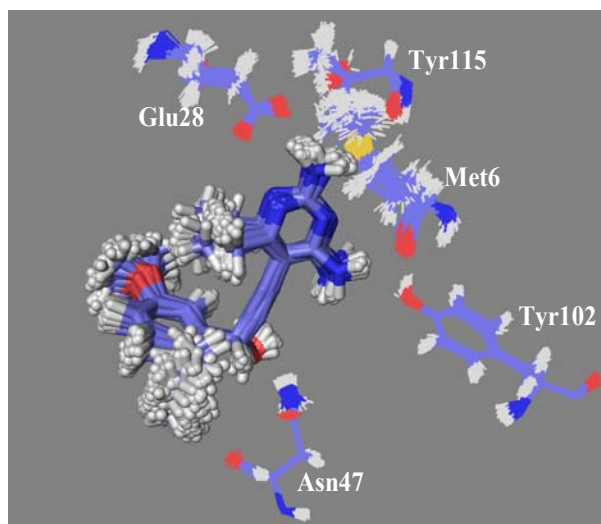


Figure 11 Dynamic frames. Prototype 12 inside *Ba*DHFR. The cofactor was omitted for better visualization

It is noteworthy that other groups, such as -OMe, -CH₃, -NH₂, -OH -CH₂OH and -CH₂CH₃, were also tested in both positions, but did not show favorable results. It was observed that by replacing both compound **1** and **4** with the more bulky substituents there was an improvement in the energy of interaction between the compound formed and the active site *Hss*DHFR, which is not favorable for our work. This effect can be explained by the difference cavity volume *Hss*DHFR be much larger than the *Ba*DHFR, accommodating the best inhibitor.

5 CONCLUSIONS

The energies obtained in the docking studies indicated a good correlation between the theoretical and experimental data, corroborating the results of Beierlein et al. [15] that pointed inhibitor **1** as the best *Ba*DHFR inhibitor.

The results obtained by MD simulations confirm the results obtained in the docking studies, showing that these compounds remain well stabilized and anchored inside the active sites of both enzymes during the simulated time in all the studied systems.

Inhibitor 1 was chosen as the most promising lead for new prototypes of inhibitors for *Ba*DHFR, based on their experimental results and theoretical good overall result. Through modifications in its structure we proposed prototype **12** that, in turn, showed promising results in the docking and MD studies. So, we proposed this prototype for further experimental investigation.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Brazilian financial agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Ministério da Defesa (CAPES/MD) (Edital PRODEFESA 2008) for financial support, and the Military Institute of Engineering (IME) and Federal University of Lavras (UFLA) for providing the physical infrastructure and working space.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: TCR, TCCF. Performed the experiments: JOSG, DTM, APG. Analyzed the data: JOSG, ASG, TCCF. Contributed reagents/materials/analysis tools: ASG, EFFC. Wrote the paper: JOSG, TCR, TCCF.

6 REFERENCES

1. Guimarães AP, Oliveira AA, da Cunha EFF, Ramalho TC, França, TCC (2011) Analysis of *Bacillus anthracis* nucleoside hydrolase via *in silico* docking with inhibitors and molecular dynamics simulation. *J Mol Model* 17: 2939–2951.
2. Goldman DL, Arturo C (2008) Anthrax-associated shock. *Front Biosci* 13: 4009–4014.
3. Ireng LM, Gala JL (2012) Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 1411–1422.
4. Kurosaki Y, Sakuma T, Fukuma A, Fujinami Y, Kawamoto K, Kamo N, Makino SI, Yasuda J (2009) A simple and sensitive method for detection of *Bacillus anthracis* by loop-mediated isothermal amplification. *J Appl Microbiol* 107: 1947-1956.
5. Verma RP, Hansch C (2008) Combating the threat of anthrax: a quantitative structure-activity relationship approach. *Mol Pharm* 5: 745-759.
6. Carlson PEJ, Dixon SD, Janes BK, Carr KA, Nusca TD, Anderson EC, Keene SE, Sherman DH, Hanna PC (2010) Genetic analysis of petrobactin transport in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 75: 900-909.
7. Carr KA, Lybarger SR, Anderson EC, Janes BK, Hanna PC (2010a) The role of *Bacillus anthracis* germinant receptors in germination and virulence. *Mol Microbiol* 75: 365-375.
8. Carr KA, Janes BK, Hanna PC (2010b) Role of the gerP operon in germination and outgrowth of *Bacillus anthracis* spores. *PLoS One* 5: e9128-9134.
9. Chen G, Driks A, Tawfiq K, Mallozzi M, Patil S (2010) *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* Spore surface properties and transport. *Colloids Surf B Biointerfaces* 76: 512-518.
10. Li Y, Catta P, Stewart KA, Dufner M, Setlow P, Hao B (2011) Structure-based functional studies of the effects of amino acid substitutions in GerBC, the C subunit of the *Bacillus subtilis* GerB spore germinant receptor. *J Bacteriol* 193: 4143–4152.

11. Meric M, Willke A, Muezzinoglu B, Karadenizli A, Hosten T (2009) A case of pneumonia caused by *Bacillus anthracis* secondary to gastrointestinal anthrax. *Int J Infect Dis* 13: e456-463.
12. Bourne CR, Bunce RA, Bourne PC, Berlin KD, Barrow EW, Barrow WW (2009) Crystal structure of *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase with the dihydrophthalazine-based trimethoprim derivative RAB1 provides a structural explanation of potency and selectivity. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3065-3073.
13. Bennett BC, Xu H, Simmerman RF, Lee RE, Dealwis CG (2007) Crystal structure of the anthrax drug target, *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase. *J Med Chem* 50: 4374-81.
14. Bennett BC, Wan Q, Ahmad MF, Langan P, Dealwis CG (2009) X-ray structure of the ternary MTX-NADPH complex of the anthrax dihydrofolate reductase: a pharmacophore for dual-site inhibitor design. *J Struct Biol* 166: 162-171.
15. Beierlein J, Frey K, Bolstad D, Pelphrey P, Joska T, Smith A, Priestley N, Wright D, Anderson A (2008) Synthetic and Crystallographic Studies of a New Inhibitor Series Targeting *Bacillus anthracis* Dihydrofolate Reductase. *J Med Chem* 51: 7532-7540.
16. Li XM, Hilgers M, Cunningham M, Chen ZY, Trzoss M, Zhang JH, Kohonen L, Lam T, Creighton C, Kedar GC, Nelson K, Kwan B, Stidham M, Brown-Driver V, Shaw KJ, Finn J (2011) Structure-based design of new DHFR-based antibacterial agents: 7-aryl-2,4-diaminoquinazolines. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 5171-5176.
17. Nammalwar B, Bunce RA, Berlin KD, Bourne CR, Bourne PC, Barrow EW, Barrow WW (2012) Synthesis and biological activity of substituted 2,4-diaminopyrimidines that inhibit *Bacillus anthracis*. *Eur J Med Chem* 54: 387-396.
18. Beierlein JM, Deshmukh L, Frey KM, Vinogradova O, Anderson AC (2009) The solution structure of *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase yields insight into the analysis of structure-activity relationships for novel inhibitors. *Biochemistry* 48: 4100-4108.

19. Sharma M, Chauhan PM (2012) Dihydrofolate reductase as a therapeutic target for infectious diseases: opportunities and challenges. *Future Med Chem* 4: 1335-65.
20. Beierlein JM, Karri, NG, Anderson, AC (2010) Targeted Mutations of *Bacillus anthracis* Dihydrofolate Reductase Condense Complex Structure-Activity Relationships. *J Med Chem* 53: 7327–7336.
21. Pelphrey P, Popov V, Joska T, Beierlein J, Bolstad E, Fillingham Y, Wright D, Anderson A (2007) Highly efficient ligands for DHFR from *Cryptosporidium hominis* and *Toxoplasma gondii* inspired by structural analysis. *J Med Chem* 50: 940–950.
22. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235–242.
23. O'neil RH, Lilien RH, Donald BR, Stroud RM, Anderson AC (2003) Phylogenetic Classification of Protozoa Based on the Structure of the Linker Domain in the Bifunctional Enzyme, Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase. *J Chem Biol* 278: 52980–52987.
24. Thomsen R, Christensen MH (2006) MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. *J Med Chem* 49: 3315-3332.
25. Hehre WJ, Deppmeier BJ, Klunzinger PE (1999) PC SPARTAN Pro. Wavefunction, Inc. Irvine, California.
26. Jorgensen WL, Tirado-Rives J (1988). The OPLS Force Field for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J Am Chem Soc* 110: 1657–1666.
27. Hess B, Kutzner C, Van der Spoel D, Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J Chem Theo Comput* 4: 435-447.
28. Sousa da Silva AW, Vranken WF (2012) ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Res Notes* 5: 367-374.
29. Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA (2006) Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Mod* 25: 247-260.

30. Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins Struct Funct Bioinformat* 59: 687-696.

ARTIGO 2**MOLECULAR MODELING STUDIES BETWEEN OXIME BI-6 AND
MmAChE INHIBITED BY DIFFERENT ORGANOPHOSPHORUS****Juliana de O. S. Giacoppo¹, Tanos C. C. França², Kamil Kuča³, Elaine F. F.
da Cunha¹, Daiana T. Mancini¹, Teodorico C. Ramalho¹**

¹Laboratory of Molecular Modeling, Chemistry Department, Federal University of
Lavras, Lavras-MG, Brazil

²Laboratory of Molecular Modeling Applied to the Chemical and Biological Defense
(LMCBD), Military Institute of Engineering, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

³Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences UO, University of
Defence, Czech Republic

Versão preliminar para o periódico European Journal of Medicinal Chemistry

1 ABSTRACT

The nerve agents are potent inhibitors of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for performing the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine, and consequently the termination of the transmission of nerve impulses. The process of AChE inhibited by an organophosphate can be reversed by a nucleophilic agent, which is responsible for dephosphorylation of Ser203 in the active site of the enzyme. In this sense, the oximes are compounds of this characteristic, which are capable of removing the neurotoxin and reactivate the enzyme. In this paper, we apply a methodology of theoretical docking and QM/MM using the Molegro® and Spartan® software to evaluate the kinetic constants of reactivation analyzing the interaction of the oxime BI-6 with the enzyme inhibited by different organophosphorus compared with data obtained in vitro. The results confirm that this method is suitable for the prediction of kinetic and thermodynamic parameters of oximes, which may be useful in the design and selection of new and more effective oximes.

Keywords: Chemical Warfare, Organophosphates, Acetylcholinesterase, QM/MM, Docking, Oximes.

RESUMO

Os agentes nervosos são potentes inibidores da acetilcolinesterase (AChE), a enzima responsável por realizar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, e, conseqüentemente, a conclusão da transmissão de impulsos nervosos. O processo de inibição da AChE por um organofosforado pode ser revertido por um agente nucleófilo, que é responsável pela desfosforilação de Ser203 no sítio ativo da enzima. Neste sentido, as oximas são compostos de tal característica que são capazes de remover o neurotóxico e reativar a enzima. Neste trabalho, aplicou-se uma metodologia de ancoramento molecular teórico e QM/MM, utilizando-se os softwares Molegro[®] e Spartan[®], para avaliar as constantes cinéticas de reativação, analisando-se a interação da oxima BI-6 com a enzima inibida por diferentes organofosforados, em comparação com os dados obtidos *in vitro*. Os resultados confirmam que este método é adequado para a predição de parâmetros cinéticos e termodinâmicos de oximas, os quais podem ser úteis no desenho e na seleção de novas e mais eficazes oximas.

Palavras-chave: Guerra Química, Organofosforados, Acetilcolinesterase, QM/MM, *Docking*, Oximas.

2 INTRODUCTION

The chemical warfare agents (sarin, soman, cyclosarin, tabun, VX, RVX) are extremely toxic organophosphorus compounds [1,2]. These compounds, also known as nerve agents, inhibit the activity of acetylcholinesterase (AChE) in the synapses depositing a phosphoryl group in its active site, resulting in the accumulation of acetylcholine (ACh) and uncontrolled activation of cholinergic synapses [3,4,5,6]. These cause a breakdown in the central nervous system. Symptoms include anxiety, loss of coordination, seizures and death [7].

After inhibition of AChE by organophosphate (OP), two processes can occur: aging or spontaneous reactivation of the enzyme, which may be accelerated by several orders of magnitude by addition of a strong nucleophile such as an oxime [8]. However, without the presence of oximes, the reaction to reactivate for most aging [9].

The process of inhibition of the AChE by OP can be reversed before the aging step in which the enzyme is inhibited irreversibly. The reactivation of AChE is based on the dephosphorylation of serine (Ser203) that is in its active site. This is the main mechanism of oxime action. In the case of presenting aromatic nitrogen, during the reactivation process there is an attraction of the positively charged nitrogen portion of this by the anionic site of the AChE thereby allowing the active portion of oxime to be positioned over the phosphorylated site of AChE, and promote nucleophilic attack as can be seen in Fig. 1.

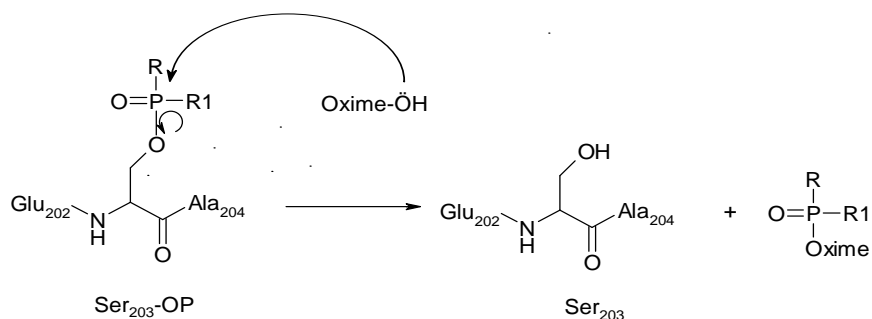


Figure 1 Reaction reactivation of OP-AChE conjugate by an oxime, where R is alkyl, O-alkyl or amide; R1 group or O-alkyl amide

The reactivation reaction involves, first, the association of the oxime to the inhibited enzyme (EI-Ox) and then the reactivation of the enzyme by the leaving of the oxime complexed to the neurotoxic agent (I-Ox) (Fig. 2) [7,10,11].



Figure 2 Scheme of AChE reactivation by an oxime

Where K_R and kr are constants, which represent the affinity of oximes for the inhibited AChE, and the rate constant for the decomposition of the stable enzyme-inhibitor-reactivator complex, respectively [7,10,11].

The objective of this work is the description at the molecular level of the interactions between the oxime BI-6 and AChE inhibited by different organophosphorus. For this purpose, it is intended to employ hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) techniques, allowing the study of chemical reactions in order to reach a possible reactivation mechanism of the enzyme inhibited.

3 METHODS

3.1 Ligands data set and docking energy calculations

Crystallographic coordinates of *MusMusculus* (MmAChE) phosphorylated by Sarin and complexed with the oxime HI-6 were taken from the Brookhaven Protein Data Bank (PDB code: 2WHP) [12]. The structure of oxime HI-6 that is within the AChE was modified for the oxime BI-6 through substitution between the rings of -O- by -HC=CH- using the software Spartan08® [13] in order to obtain the 3D structure of AChE reactivated by BI-6 necessary for the development of studies in this work (Fig. 3).

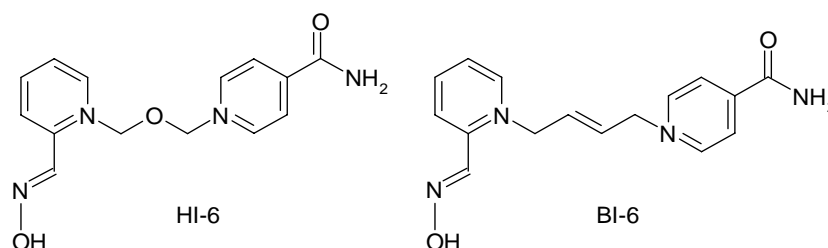


Figure 3 Structures of oximes HI-6 and BI-6

The three-dimensional structures of each organophosphorus shown in Fig. 4 were constructed based on the structure of sarin also using the program Spartan08® [13]. Subsequently, the overall geometry optimizations and partial atomic charge distribution calculations were performed with the same program using the AM1 semi-empirical molecular orbital method.

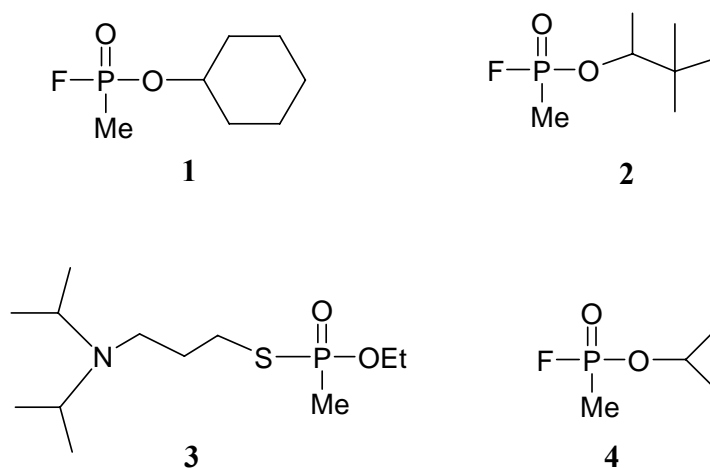


Figure 4 Structure of organophosphates studied: (1) Cyclosarin; (2) Soman; (3) VX and (4) Sarin

First, the molecular docking study of organophosphates was conducted in the active site of the *Mm*AChE enzyme, in order to obtain the most stable conformations of these compounds. Note that for this, Sarin was selected as active binder. After analyzing the results we selected the best poses. For completion of docking and re-docking, we used the Molegro® Virtual Docker 2006 (MVD) program [14]. The low-energy interaction modes were then chosen for further minimizations. From the molecular docking simulations performed between each studied compound and the enzyme, the binding modes with the lowest docked energies were selected.

Calculations were performed according to the instructions. Binding sites were restricted within spheres with radius from 7Å centered at the BI-6 binding site in the protein complex and enclosing all the active site residues. Due to the stochastic nature of the ligand–protein docking search algorithm, about 15 runs were conducted and 30 docking solutions were retained for each ligand. The best superimposing poses related to BI-6, were chosen for the analysis performed in this work.

3.2 Theoretical calculations on Reaction Mechanistics

The reaction mechanism and DFT calculations were made in the programs Spartan08[®] [13] and Gaussian09[®] [15], respectively. The QM regions were cut out from the docking results in the SPDB Viewer software [16]. This region consists of the reaction mechanism of the catalytic triad residues (Ser203, Glu334 and His447), residues that underwent hydrogen interactions with the oxime, peptide bonds neighboring bonded atoms and cofactor. All transition states, intermediates and precursors involved were calculated and characterization of these transition states was performed by calculation of imaginary frequency. Each conformer was fully optimized at both levels, PM3 and DFT with gradient algorithms conjugation and quasi-Newton-Raphson. The final geometry was obtained by the density functional Becke's functional corrected gradient and Lee, Yang, and Paar (B3LYP) [17] using basis set 6-31G+(d, p).

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Docking results

The cavity (Fig. 5) of the *Mm*AChE active site was calculated by MVD[®] as having 175,104 Å³.

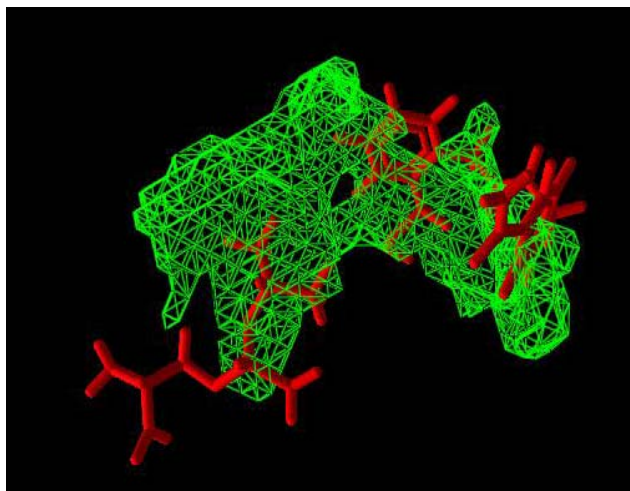


Figure 5 Cavity of *Mm*AChE containing the oxime BI-6 and organophosphate sarin

With the re-docking studies all reasonable guidelines related to the reactivation of *Mm*AChE were investigated, following a search of the conformational space and different orientations of the ligand. The lowest energy models of interaction were chosen for further minimization. Table 1 lists the residues present and the interactions and energies obtained with docking calculations.

Table 1 Docking results for the BI-6 docked in *MmAChE*.

System	Residue	Bond strength (kcal mol ⁻¹)	Distance (Å)	ΔE^* (kcal mol ⁻¹)	H-bond energy (kcal mol ⁻¹)	Exp. Values reactivation process (%)
1	Tyr124	-2.50	3.09	-159.44	-5.52	1
	Tyr124	-0.52	3.49			
	Tyr124	-2.50	2.65			
2	Tyr124	-2.50	3.03	-152.14	-9.37	9
	Tyr124	-2.50	2.95			
	Tyr124	-2.50	2.85			
	Glu285	-1,87	3.22			
3	Tyr124	-1.84	3.23	-155.54	-4.34	22
	Tyr124	-2.50	2.92			
4	Tyr124	-0.78	3.44	-152.21	-3.61	32
	Tyr124	-2.21	3.16			
	Tyr124	-0.62	2.37			

* ΔE =Intermolecular energy

The intermolecular interaction energy in all cases presented very close values, which was expected because we performed the re-docking of the same oxime, which also influences the interactions of hydrogen. With the exception of the docking related to system 2, which also showed interaction with the Glu285 residue, all others showed more of an interaction with the Tyr124 residue (Figure 6). Thus, it is clear that the number of hydrogen bonds with this amino acid is a key feature to determine the interaction mode of the oxime.

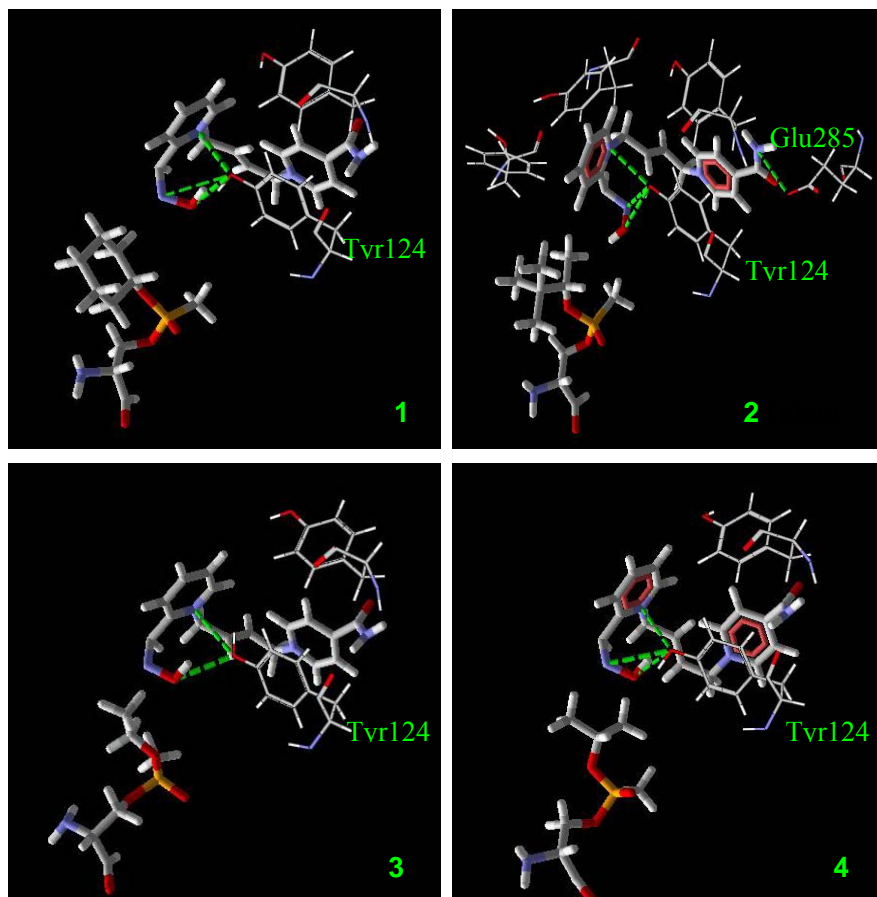


Figure 6 Hydrogen bonds formed between BI-6 and residues of the *Mm*AChE active site. The reactivators are indicated in the figure itself

From Figure 3 it is also possible to note p-p stacking interaction between the pyridinium ring of the oxime and amino acid residue Tyr124. Long-range interactions such as this provide extra stabilizing to the transition state. This interaction was also observed in a previous study conducted by our research group (MATOS et al., 2011).

It is important to notice that the interaction energy cannot explain the experimental results ($R^2 = 0.07$, Fig. 7). In line with that, we then performed

theoretical calculations for determining the relative activation energy for the compounds.

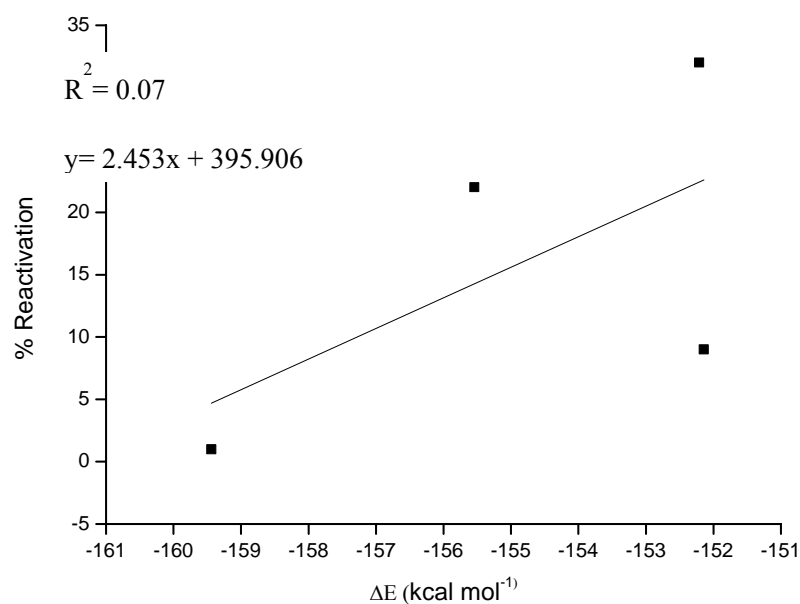


Figure 7 Plot of reactivation % *versus* interaction energy for the systems studied

4.2 Mechanism Studies

To design new and more selective agents, reactivation is very important to understand the mechanism of the AChE reactivation process by oximes. Furthermore, one should always take into account dynamic effects of the reaction mechanism and the orientation of the binder. The mechanism is through an additional route of elimination. This QM/MM study is a first step in understanding the interaction between AChE reactivators and the inhibited enzyme by different organophosphates.

However, in our present study, we have compared the ΔE^\ddagger values between the transition state and the initial system for each system (Table 2). In

this way, we have obtained the oxime reactivity tendency, thus avoiding the direct computation of the absolute energy values. After optimization of conformers selected, a force constant calculation was performed to ensure that the structures reported in Table 2 are all transition states.

Table 2 Experimental results, intermolecular energy and relative activation energies for the studied compounds

System	<i>Experimental</i> (% <i>Reactivation</i>)	ΔE (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta E^{\#b}$ (kcal mol ⁻¹)	Frequency/cm ⁻¹
1	1	-159.44	0.00	i97.88
2	9	-152.14	-18.16	i95.83
3	22	-155.54	-21.95	i100.25
4	32	-152.21	-28.22	i97.95

$$^b\Delta\Delta E^{\#} = \Delta_{LIG2} - \Delta_{LIG1}$$

Table 2 presents the kinetic parameters, $\Delta\Delta E^{\#}$ predicted by theoretical calculations of the oximes and the experimental values and the respective imaginary frequencies, which characterize the transition state structures. As observed previously, the interaction energies from the docking calculations are very similar among the studied compounds, therefore the experimental data can not be rationalized just with EI values. Turning now to the reaction step between oxime and the neurotoxic agent, the $\Delta\Delta E^{\#}$ values can just rationalize, in part, the experimental results ($R^2=0.75$, Fig. 8). It is expected that a better correlation between theory and experiment can be reached when other effects related to the binding process are included.

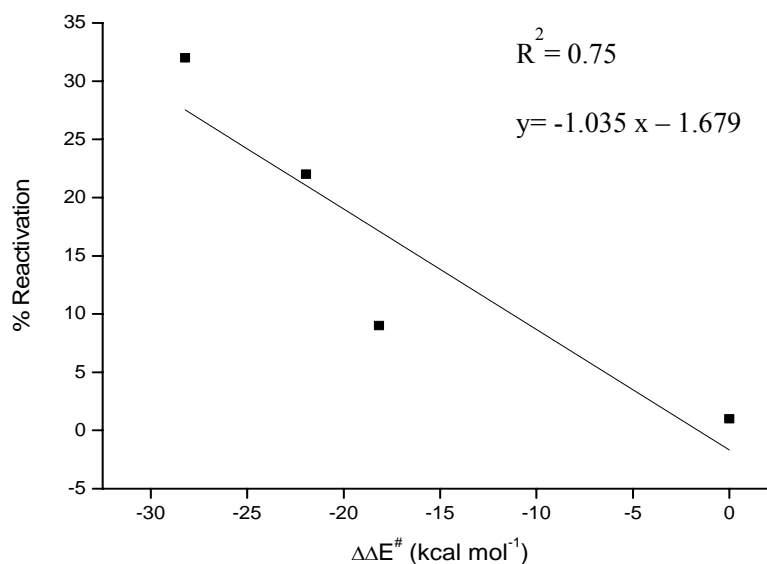


Figure 8 Plot of % Reactivation *versus* $\Delta\Delta E^\ddagger$ for the studied systems

In fact, the reactivation process depends on both steps: 1) association of the oxime to the inhibited enzyme (EI-Ox) and 2) the chemical reaction between oxime and neurotoxic agent (I-Ox) (Figure 2).

From the data presented in Table 2, a mathematical model was constructed using the multiple linear regression method (MLR) resulting in Equation 1 for predicting the % reactivation of the studied systems.

$$\% \text{ Reactivation} = -2.39(\Delta E) - 1.62(\Delta\Delta E^\ddagger) - 381.15 \quad (\text{Equation 1})$$

The theoretical values for reactivation % obtained from Equation 1 showed a good correlation ($R^2 = 0.93$, Fig. 9) with the experimental results.

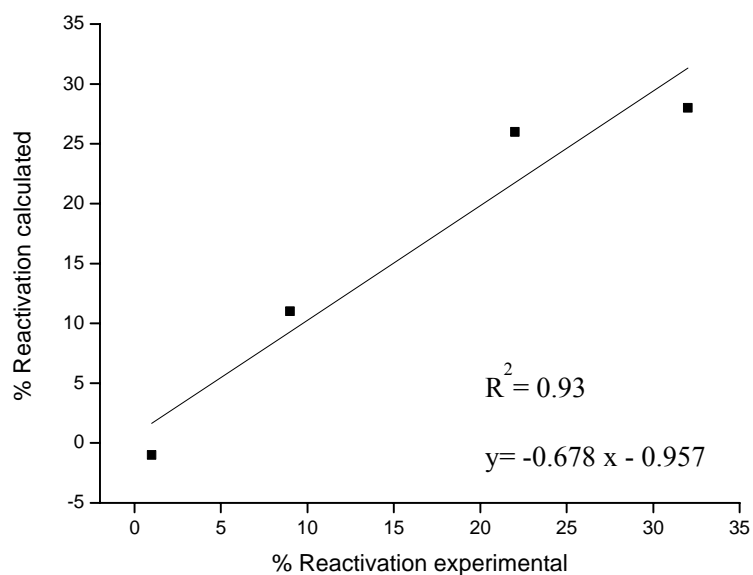


Figure 9 Correlation between the values of experimental and % reactivation calculated

The same correlation was not observed for the binding and kinetics parameters separately ($R^2=0.07$ and $R^2=0.75$, respectively). So, our theoretical findings put in evidence that the binding and chemical reaction steps play an important role in the reactivation process. Continuing from lower to higher $\Delta\Delta E^\ddagger$ values, the % reactivation decreased significantly; on the other hand, lower binding energy values lead to a higher % reactivation. It is noteworthy that coefficients for IE and $\Delta\Delta E^\ddagger$ values in Equation 1 are similar, but the kinetic parameters are more sensitive to slight variations.

5 CONCLUSIONS

The molecular modeling studies of oximes as *Mm*AChE reactivators are important in understanding their action mechanism and the subsequent design of new AChE reactivators.

Our results suggest that the docking process of interaction of the BI-6 oxime is favorable through Tyr124 and Glu285 aminoacids residues. Since the number of hydrogen bonds with Tyr124 is a key feature to determine the interaction mode with this oxime. Furthermore, this residue has a π - π stacking interaction with the oximes pyridinium ring, which contributes to stabilization of the transition state.

When analyzing the interaction energy results, we noted that these do not explain the experimental values. Thus, theoretical calculations were performed to calculate the activation energy on this compound which showed good correlation with the % reactivation values. But for the correlation interaction energy, activation energy and % reactivation, we obtained an $R^2=0.93$ which leads us to conclude that our theoretical findings put in evidence that both binding and chemical reaction steps play an important role in the reactivation process.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Brazilian financial agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Ministério da Defesa (CAPES/MD) (Edital PRODEFESA 2008) for financial support, and the

Military Institute of Engineering (IME) and Federal University of Lavras (UFLA) for providing the physical infrastructure and working space.

5 REFERENCES

- [1] G. Saint-André, M. Kliachyna, S. Kodepelly, L. Louise-Leriché, E. Gillon, P. Renard, F. Nachon, R. Baati, A. Wagner, Design, synthesis and evaluation of new α -nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase, *Tetrahedron* 67 (2011) 6352-6361.
- [2] J. Patočka, J. Cabal, K. Kuča, D. Jun, Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics, *J. Appl. Biomed.* 3 (2005) 91-99.
- [3] M. Eddleston, L. Szinicz, P. Eyer, N. Buckley, Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials, *Quar. J. Med.* 95 (2002) 275-283.
- [4] K. Kuca, K. Musilek, M. Paar, D. Jun, P. Stodulka, M. Hrabínová, J. Marek, Targeted Synthesis of 1-(4-Hydroxyiminomethylpyridinium)-3-pyridiniumpropane Dibromide – A New Nerve Agent Reactivator, *Molecules* 12 (2207) 1964-1972.
- [5] O. Soukup, Z. Kristofíková, J. Proška, G. Tobin, J. Patočka, J. Marek, D. Jun, J. Fusek, D. Ripová, K. Kuca, Novel acetylcholinesterase reactivator K112 and its cholinergic properties, *Biomed. Pharmacother.* 64 (2010) 541-545.
- [6] D. Matatagui, J. Martí, M.J. Fernández, J.L. Fontecha, J. Gutiérrez, I. Gràcia, C. Cané, M. C. Horrillo, Chemical warfare agents simulants detection with an optimized SAW sensor array, *Sensor Actuat. B-Chem.* 154 (2011) 199-205.
- [7] K.S. Matos, D.T. Mancini, E.F.F. da Cunha, K. Kuca, C.C.T. França, T.C. Ramalho, Molecular aspects of the reactivation process of acetylcholinesterase inhibited by ciclosarin, *J. Braz. Chem. Soc. (Impresso)* 22 (2011) 1999-2004.

- [8] F. Worek, M. Koller, H. Thiermann, L. Szinicz, Diagnostic aspects of organophosphate poisoning, *Toxicology* 214 (2005) 182-189.
- [9] A. Hörnberg, A. Tunemalm, F. Ekström, Crystal Structures of Acetylcholinesterase in Complex with Organophosphorus Compounds Suggest that the Acyl Pocket Modulates the Aging Reaction by Precluding the Formation of the Trigonal Bipyramidal Transition State, *Biochemistry* 46 (2007) 4815-4825, 2007
- [10] T.C. Ramalho, T.C.C. França, A.P. Guimarães, M.N. Renno, E.F.F. Cunha, Development of new acetylcholinesterasereactivators:molecular modeling versus in vitro data, *Chem.-Biol. Inter. (Print)* 185 (2010) 73-77.
- [11] J. Kassa, K. Kuca, L. Bartosova, G. Kunesova, The development of new structural analogues of oximes for the antidotal treatment of poisoning by nerve agents and the comparison of their reactivating and therapeutic efficacy with currently available oximes, *Cur. Org. Chem.* 11 (2007) 267-283.
- [12] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The protein data bank, *Nucl. Acids Res.* 28 (2000) 235-242, 2000.
- [13] W.J. Hehre, B.J. Deppmeier, P.E. Klunzinger, PC Spartan Pro. Wavefunction: Irvine, 1999. Software.
- [14] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking, *J. Med.Chem.* 49 (2006) 3315-3332.
- [15] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg,

S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

- [16] N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714 -2723.
- [17] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785-789.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente trabalho, investigou-se a seletividade de inibidores da enzima *BaDHFR*. Notou-se que os resultados teóricos corroboram os dados experimentais e que o estudo das estruturas dos inibidores permitiu a construção de uma nova molécula, com potencial atividade e melhor seletividade para a *BaDHFR*. Esta molécula, por sua vez, apresenta resultados promissores em valores de energia obtidos no *docking*, os quais foram favorecidos pelas interações com os resíduos de aminoácido Met6, Glu28, Asn47, Tyr102 e Thr115. Com relação aos estudos de DM, observou-se a permanência deste composto no sítio ativo das enzimas durante o tempo simulado. Assim, com base nestes e em outros resultados, foi possível propor este composto para investigação mais detalhada sobre sua atividade.

Com relação ao estudo da interação da oxima BI-6 com a *MmAChE*, inibida pelos agentes de guerra química ciclosarin, soman, VX e sarin, os resultados sugerem que a interação desta oxima é favorável por meio dos resíduos de aminoácidos Tyr124 e Glu285, uma vez que o número de ligações de hidrogênio com o Tyr124 é uma característica essencial para determinar o modo de interação com a mesma. Além disso, ao analisar os resultados de energia de interação obtidos, percebe-se que estes não explicam os valores experimentais de porcentagem de reativação. Assim, foram realizados cálculos teóricos da energia de ativação, a qual apresentou boa correlação com os valores de porcentagem de reativação. Entretanto, ao correlacionar a energia de interação, a energia de ativação e os valores experimentais de porcentagem de reativação, foi obtido um $R^2 = 0,93$, o que leva a concluir que os achados teóricos resultantes deste trabalho colocam em evidência que tanto a interação quanto a reação química têm um papel importante no processo de reativação.

Com base nos resultados, pode-se inferir que este estudo é útil no entendimento da seletividade de inibidores, assim como na busca por novos inibidores para os agentes de guerra biológica. Além disso, a metodologia é eficiente em estudos de mecanismo de reação envolvendo reativadores e a AChE inibida por agentes de guerra química. É importante lembrar que cálculos computacionais são importantes nos estudos referentes a compostos utilizados em guerras, uma vez que uma das problemáticas de estudos deste tipo é a manipulação dessas substâncias em laboratório. Com os cálculos, há um direcionamento para os compostos que apresentam resultados mais promissores, evitando que inúmeros testes sejam realizados.