



**KARINA SILVIA MATOS**

**ASPECTOS MOLECULARES DA REATIVAÇÃO  
DA ACETILCOLINESTERASE INIBIDA POR  
CICLOSARIN E CARBOFURANO**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**KARINA SILVIA MATOS**

**ASPECTOS MOLECULARES DA REATIVAÇÃO DA  
ACETILCOLINESTERASE INIBIDA POR CICLOSARIN E  
CARBOFURANO**

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

Orientadora

Dr.<sup>a</sup> Elaine Fontes Ferreira da Cunha

Coorientador

Dr. Teodorico de Castro Ramalho

**LAVRAS - MG**

**2012**

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

Matos, Karina Silvia.

Aspectos moleculares da reativação da acetilcolinesterase inibida  
por ciclosarin e carbofurano / Karina Silvia Matos. – Lavras :  
UFLA, 2012.

148 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Elaine Fontes Ferreira da Cunha.

Bibliografia.

1. Oximas. 2. Docking. 3. QM/MM. 4. Organofosforados. 5.  
Carbamatos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.758

**KARINA SILVIA MATOS**

**ASPECTOS MOLECULARES DA REATIVAÇÃO DA  
ACETILCOLINESTERASE INIBIDA POR CICLOSARIN E  
CARBOFURANO**

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

Aprovada em 15 de fevereiro de 2012.

Dr. Tanos Celmar Costra França      IME

Dr. Raimundo Vicente de Sousa      UFLA

Dr. Matheus Puggina de Freitas      UFLA

Dr. Teodorico C. Ramalho      UFLA

Dr.<sup>a</sup>. Elaine Fontes Ferreira da Cunha  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2012**

## AGRADECIMENTOS

Gratidão. Por vezes, é palavra esquecida em nossos corações agitados e iludidos com as muitas conquistas imediatas que alcançamos. Esquecida, de forma que, nem se quer pensamos em seu real significado. Talvez eu ainda não o conheça exatamente, mas já ouvi dizer uma vez, que um momento de preguiça é um momento de ingratidão para com Deus. Então, comecei a pensar que a gratidão tem algo haver com ação, movimento, trabalho. E hoje, penso que gratidão, principalmente para com Deus, pode, e deve ser expressa na forma de trabalho. Não só o trabalho pelo sustento material; mas qualquer que seja o serviço útil a alguém. Trabalho em cuidar dos recursos que a vida me oferece, em cuidar das pessoas como se elas fossem tesouros; trabalho de transformar oportunidades em conquistas, por mérito. Trabalho intelectual, a fim de superar-me a cada dia. Trabalho interno, por regeneração interior, em expressões de amor. Trabalho pelo belo, pelo bom e pelo bem.

À Deus sou grata pelo corpo saudável que serve de instrumento a um espírito sedento de aprendizado. Pelo ar que o abastece, pela água que o irriga de vida e pelos recursos que o alimentam e protegem. Pelas alegrias e dores que permeiam meus caminhos, oferecendo oportunidades de tornar-me melhor. Pela força, amor e alegria, que me fazem seguir sempre adiante.

Aos meus pais, Marlene e Antônio Claret, o meu coração vibra gratidão pelo carinho, amor, apoio e confiança, pelos exemplos de determinação, por todo suporte em todos os momentos da minha vida, pelo dia a dia único com vocês, por serem tão especiais, e por acreditarem em mim.

À minha irmã Lays, sou muito grata pelo companherismo e amizade. Pelas tardes divertidas e de “comilanças”, pelos “copos d’água”, por todos os

brigadeiros nos dias de ansiedade, pela companhia em dias de solidão, e pela cumplicidade sempre.

À minha irmã Fabiana pelo amor e ajuda sempre que preciso.

Ao querido Rodrigo, pelo amor, carinho e dedicação, paciência, parceria e ajuda sempre, pela amizade que me orienta com muita sensatez e amor conduzindo-me com segurança a continuar, por compartilhar sonhos e metas, e por aceitar fazer parte da minha vida.

À minha família, avós, tios, tias, primos e primas pelo apoio e incentivo sempre.

Receba também minha gratidão pelos muitos momentos bons:

- ✓ Os amigos do GEAK, em especial os da Infância e Juventude, e as crianças, por tudo.
- ✓ Os amigos do CEAS e os amigos do Sopão pelas oportunidades.
- ✓ As “amigas dançarinas” pela alegria compartilhada.
- ✓ Os amigos do “Shatothorix” e companhia de Varginha.
- ✓ Os amigos da 2005/2, afinal, “como poderei viver sem a sua, sem a sua companhia?”.
- ✓ Os amigos que sempre me aceitam de “vela”, sempre com muito carinho.
- ✓ A amiga Michelle, por ser minha irmã de alma e pela cumplicidade.
- ✓ As amigas Rafa e “Carina com C”, pela amizade incondicional.
- ✓ O amigo Ernani por me inspirar à arte e pela empatia.
- ✓ Os amigos Marina, Gilson, Maria José, Marisa, Sônia Z. e Sônia A., por tantos ensinamentos, carinho e amizade.
- ✓ Os amigos Bernadete, Sidney e Eduardo, pela torcida de sempre.
- ✓ Todos os amigos do Grupo de Química Computacional, a “Era do gelo”, por tornar os dias mais divertidos. Em especial ao Régis e a Ju, pela ajuda e disponibilidade sempre. E a Dai, a Mel, Marilua e Priscilinha

(quase da Era do gelo), que além de tudo, sei que encontrei amizade pra sempre.

E minha sincera gratidão, aos meus orientadores, Prof<sup>ª</sup>. Elaine e Prof. Teodorico, pela confiança em mim depositada para realização do trabalho, pela paciência e atenção dispensadas sempre. Mas principalmente, pela convivência enriquecedora, pela amizade, pelas longas conversas, pela orientação e pelos conselhos, não só na pesquisa, mas na vida também. Por todos os ensinamentos que levarei sempre comigo. Pelo carinho.

Ao Prof. Matheus pelo convívio, pelos incentivos e pelo carinho.

Ao Prof. Matheus, ao Prof. Raimundo e ao Prof. Tanos, por aceitarem o convite de participação na banca e suas contribuições.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realização deste trabalho.

## RESUMO

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A reação entre o resíduo de Ser203 do sítio ativo da AChE e agentes dos nervos, tais como compostos organofosforados (OP) ou carbamatos (CB) resulta na inibição da enzima. A ação dos agentes dos nervos como inibidores da AChE, interrompe a hidrólise da ACh, e pode conduzir a uma inibição irreversível desta enzima resultando assim na síndrome colinérgica. Para evitar isto, é necessário um nucleófilo, como uma oxima, cujo grupo hidroxila, é capaz de remover o agente do nervo do sítio ativo e reativar a AChE. Embora tenham alta toxicidade comprovada, os OP e CB são largamente utilizados como pesticidas na agricultura. Neste trabalho, nós aplicamos uma metodologia teórica de *docking* e QM/MM, desenvolvida em um trabalho anterior, usando os softwares Molegro® e Spartan®, para avaliar as constantes cinéticas de reativação e associação de algumas oximas, em comparação com dados *in vitro* reportados previamente na literatura para a *Mus Musculus* (*MmAChE*). Nossos resultados apresentaram uma boa correlação entre as energias livres de ligação e os dados experimentais das oximas, o que indica que esta metodologia é adequada para a predição de parâmetros cinéticos e termodinâmicos, que podem ser úteis para o projeto e seleção de novas e mais eficazes oximas. Além disto, o presente estudo foi realizado em quatro sistemas: i) AChE de camundongo e humana inibidas pelo OP ciclosarin, e ii) AChE de camundongo e humana inibidas pelo CB carbofurano. O alto grau de identidade sequencial entre as enzimas de camundongo e humana, sugerem, em princípio, que os dados experimentais para AChE de camundongo podem ser extrapolados para a *HsAChE*. Finalmente, nossos achados sugerem as oximas K005 e HLö-7 como protótipos potenciais para o planejamento de reativadores da AChE inibida por ciclosarin (OP) ou carbofurano (CB).

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Oximas. *Docking*. QM/MM. Organofosforados. Carbamatos.



## ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) is the enzyme responsible for hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine. The reaction between the Ser203 residue of the AChE active site and nerve agents, such as organophosphate (OP) and carbamate (CB) results in inhibition of the enzyme. The action of the nerve agents as inhibitors of AChE, stops the hydrolysis of acetylcholine, and can lead to an irreversible inhibition of this enzyme (aging) thus triggering the cholinergic syndrome. To avoid this it's necessary a nucleophile, like an oxime, whose hydroxyl group is believed to be able to remove the nerve agent from the active site and reactivate AChE. In spite of its high toxicity, OP and CB are also widely used as pesticides in agriculture. In this work, we applied a theoretical methodology developed in a former work, using the Molegro® and Spartan® softwares, to evaluate the association and kinetic reactivation constants of oximes, facing *in vitro* data previously reported in the literature for *Mm*ACHE. Our results showed a good agreement between the theoretical binding free energies of the oximes and experimental data, corroborating the methodology as suitable for the prediction of kinetic and thermodynamic parameters that might be helpful for the design and selection of new and more effective oximes. Furthermore, the current study was performed in four different systems: i) mouse and human AChE inhibited by OP ciclosarin, ii) mouse and human AChE inhibited by CB carbofuran. The high degree of sequential identity between the human and mouse enzymes, suggest, in principle, that the experimental data for *Mm*AChE can be extrapolated to *Hs*AChE. Finally, our findings suggest oximes K005 and HLO-7 as potential prototypes to design reactivators of AChE inhibited by ciclosarin (OP) or carbofuran (CB).

**Keywords:** Acetylcholinesterase. Oximes. Docking. QM/MM calculations. Organophosphates. Carbamates.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estruturas de alguns agentes dos nervos (compostos organofosforados).....	25
Figura 2	Estrutura tridimensional da <i>HsAChE</i> obtida do PDB (Código: 3LII). Em verde estão representadas as $\alpha$ -hélices, em amarelo as folhas $\beta$ e em cinza as alças.....	27
Figura 3	Sítio ativo da AChE.....	30
Figura 4	Hidrólise da ACh pela AChE.....	33
Figura 5	Hidrólise da ACh pela AChE. ( <i>continuação</i> ).....	34
Figura 6	Hidrólise da ACh pela AChE. ( <i>continuação</i> ).....	35
Figura 7	Estrutura geral dos compostos OP.....	37
Figura 8	Exemplos de agentes usados em guerra química.....	37
Figura 9	Estrutura geral dos carbamatos.....	38
Figura 10	Estrutura de alguns CBs mais comuns.....	39
Figura 11	Esquema da inibição da AChE por OP, sendo, R o grupo alquil, O-alquil ou amida; R1 o grupo O-alquil ou amida; e X o grupo abandonador.....	41
Figura 12	Esquema de inibição da AChE por CB sendo, R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> e R <sub>3</sub> grupos orgânicos.....	42
Figura 13	Esquema da Reativação espontânea e do Envelhecimento, sendo, R o grupo alquil, O-alquil ou amida; R1 o grupo O-alquil ou amida.....	43
Figura 14	Reação de reativação do conjugado AChE-OP por uma oxima, sendo R o grupo alquil, O-alquil ou amida; R <sub>1</sub> o grupo O-alquil ou amida.....	45
Figura 15	Reação de reativação do conjugado AChE-CB por uma oxima.....	45

Figura 16	Estrutura das oximas em estudo com atividade conhecida como reativadores de AChE-ciclosarin, descritas por KASSA (2007).....	47
Figura 17	Esquema da reativação da AChE por uma oxima.....	49
Figura 18	Variação da energia com a variação conformacional.....	54
Figura 19	Alinhamento da sequência dos resíduos das enzimas <i>HsAChE</i> e <i>MmAChE</i> . Os resíduos de aminoácidos em azul são idênticos, em vermelho são semelhantes e os resíduos em preto não apresentam identidade significativa.....	69
Figura 20	Alinhamento da sequência dos resíduos das enzimas <i>TcAChE</i> e <i>MmAChE</i> . Os resíduos de aminoácidos em azul são idênticos, em vermelho são semelhantes e os resíduos em preto não apresentam identidade significativa.....	71
Figura 21	Cavidade (rosa) da enzima <i>MmAChE</i> , com uma oxima HI-6 e o agente neurotóxico ciclosarin ancorados. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.....	74
Figura 22	Sobreposição dos reativadores depois do ancoramento. A Oxima cristalizada está representada em azul e os respectivos reativadores indicados nas figuras, estão representados em azul claro.....	78
Figura 23	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador K005 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>MmAChE-OP</i> .....	80
Figura 24	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE-OP</i> .....	80
Figura 25	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador METOXIMA ancorado e os resíduos de	

	aminoácidos no sítio ativo da <i>Mm</i> AChE-OP.....	81
Figura 26	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador K033 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>Mm</i> AChE-OP.....	81
Figura 27	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HS-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>Mm</i> AChE-OP.....	81
Figura 28	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HLö-7 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>Mm</i> AChE-OP.....	82
Figura 29	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador BI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>Mm</i> AChE-OP.....	82
Figura 30	Alguns resíduos de aminoácidos do sítio ativo da <i>Hs</i> AChE, uma oxima e o agente neurotóxico ciclosarin. Os aminoácidos His447, Glu334 e Ser203 da tríade catalítica da AChE estão indicados na figura.....	83
Figura 31	Alinhamento das sequências primárias das enzimas <i>Mm</i> AChE e <i>Hs</i> AChE. Em vermelho, os resíduos diferentes, e em azul os resíduos do sítio ativo.....	87
Figura 32	Cavidade (rosa) da enzima <i>Hs</i> AChE, com uma oxima e o agente neurotóxico ciclosarin ancorados. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.....	88
Figura 33	Sobreposição dos reativadores depois do ancoramento na <i>Hs</i> AChE. A Oxima cristalizada está representada em azul e os respectivos reativadores indicados nas figuras, estão representados em azul claro.....	91
Figura 34	Interações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o	

	reativador K005 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -OP.....	95
Figura 35	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -OP.....	95
Figura 36	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador METOXIMA e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -OP.....	95
Figura 37	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador K033 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -OP.....	96
Figura 38	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HS-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -OP.....	96
Figura 39	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HLö-7 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -OP.....	96
Figura 40	Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador BI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -OP.....	97
Figura 41	Recorte do alinhamento sequencial entre as enzimas de camundongo e humana, destacando-se o resíduo Trp286 (W) em verde.....	101
Figura 42	Sobreposição das enzimas <i>MmAChE</i> e <i>HsAChE</i> . Omitiu-se o restante dos resíduos de aminoácidos para melhor visualização. O composto HI-6 é a oxima cristalizada na <i>MmAChE</i> .....	101
Figura 43	Sobreposição das enzimas <i>MmAChE</i> cristalizada na presença	

	da oxima HI-6, <i>MmAChE</i> e <i>HsAChE</i> . Omitiu-se o restante dos resíduos de aminoácidos para melhor visualização.....	103
Figura 44	Nova oxima proposta a partir das estruturas do HLö-7 e K005.....	104
Figura 45	Alinhamento das sequências primárias das enzimas <i>MmAChE</i> e <i>TcAChE</i> . Em vermelho, os resíduos do sítio ativo.....	106
Figura 46	Carbofurano após o ancoramento molecular ligado ao resíduo de Ser203. Para melhor visualização omitiu-se o restante da enzima.....	106
Figura 47	Cavidade (rosa) da enzima <i>MmAChE</i> , com uma oxima e o agente neurotóxico carbofurano ancorados. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.....	107
Figura 48	Sobreposição dos reativadores depois do ancoramento. A Oxima cristalizada está representada em azul e os respectivos reativadores indicados nas figuras, estão representados em azul claro.....	109
Figura 49	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador K005 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>MmAChE</i> -CB.....	112
Figura 50	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>MmAChE</i> -CB.....	112
Figura 51	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador METOXIMA ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>MmAChE</i> -CB.....	113
Figura 52	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador K033	

	ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>MmAChE</i> -CB.....	114
Figura 53	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HS-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>MmAChE</i> -CB.....	114
Figura 54	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HLö-7 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>MmAChE</i> -CB.....	114
Figura 55	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador BI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>MmAChE</i> -CB.....	115
Figura 56	Cavidade (rosa) da enzima <i>HsAChE</i> , com uma oxima e o agente neurotóxico carbofurano ancorados. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.....	117
Figura 57	Sobreposição dos reativadores depois do ancoramento. A Oxima cristalizada está representada em azul e os respectivos reativadores indicados nas figuras, estão representados em azul claro.....	120
Figura 58	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador K005 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -CB.....	123
Figura 59	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -CB.....	123
Figura 60	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador METOXIMA ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -CB.....	124
Figura 61	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador K033	

	ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -CB.....	125
Figura 62	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HS-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -CB.....	125
Figura 63	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HLö-7 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -CB.....	125
Figura 64	Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador BI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da <i>HsAChE</i> -CB.....	126
Gráfico 1	Valores de energia intermolecular estimadas na análise de <i>docking</i> em comparação aos dados experimentais* (KASSA, et al., 2007).....	76
Gráfico 2	Gráfico de $-\log k_r \times \Delta\Delta E^\ddagger$ para as oximas estudadas. <b>1</b> = HI- 6, <b>2</b> = BI-6, <b>3</b> = Metoxima, <b>4</b> = HS-6, <b>5</b> = K033, <b>6</b> = K005, <b>7</b> = HLö-7.....	86
Gráfico 3	Valores de energia intermolecular estimadas na análise de <i>docking</i> em comparação aos dados experimentais* (KASSA, et al., 2007).....	90
Gráfico 4	Gráfico de $-\log k_r \times \Delta\Delta E^\ddagger$ para as oximas estudadas.....	99



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Os principais inseticidas carbamatos em uso e sua potência tóxica relativa (valores estimados em humanos) (ERDMAN, 2003; ROSMAN, 2009).....	40
Tabela 2	Estruturas dos reativadores de AChE e seus respectivos valores experimentais das constantes de dissociação do complexo reativador-enzima inibida por ciclosarin (KASSA, et al., 2007).....	63
Tabela 3	Valores da constante experimental de dissociação do complexo reativador-enzima inibida ( $pK_R = -\log K_R, \mu\text{M}$ ) (KASSA et al., 2007) e energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) proteína/inibidores obtida do ancoramento.....	75
Tabela 4	Valores do comprimento dos ângulos ( $\text{\AA}$ ) das ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores e a enzima.....	79
Tabela 5	Energias relativas de ativação e parâmetros cinéticos.....	84
Tabela 6	Valores da constante experimental de dissociação do complexo reativador-enzima inibida ( $pK_R = -\log K_R, \mu\text{M}$ ) (KASSA et al., 2007), energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) proteína/inibidores obtida do ancoramento.....	89
Tabela 7	Valores do comprimento ( $\text{\AA}$ ) e energia ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) das interações de hidrogênio e resíduos de aminoácidos com os quais as interações são formadas entre os inibidores e a enzima.....	93
Tabela 8	Energias relativas de ativação e parâmetros cinéticos.....	98
Tabela 9	Valores de energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	

	proteína/inibidores obtida do ancoramento.....	108
Tabela 10	Valores do comprimento dos ângulos (Å) das ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio (kcal mol <sup>-1</sup> ) e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores e a enzima.....	110
Tabela 11	Energias de ativação relativas.....	116
Tabela 12	Valores de energia de interação intermolecular (kcal mol <sup>-1</sup> ) proteína/inibidores obtida do ancoramento.....	118
Tabela 13	Valores do comprimento dos ângulos (Å) das ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio (kcal mol <sup>-1</sup> ) e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores e a enzima.....	121
Tabela 14	Energias relativas de ativação.....	127

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChE-OP	Acetilcolinesterase inibida por organofosforado
AChE-CB	Acetilcolinesterase inibida por carbamato
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
CB	Carbamato
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
His	Histidina
HsAChE	Acetilcolinesterase <i>Homo Sapiens</i> (humana)
Ile	Isoleucina
Lis	Lisina
MmAChE	Acetilcolinesterase <i>Mus Musculus</i> (camundongo)
OP	Organofosforado
Phe	Fenilalanina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Trp	Triptofano
TcAChE	Acetilcolinesterase <i>Torpedo Californica</i>

## LISTA DE SIGLAS

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
HF	Hartree-Fock
AM1	Método semiempírico de Química computacional
B3LYP	Método DFT de Becke, usando correlação de Lee, Yang e Parr
MVD	Molegro Virtual Docker
THI	Intermediário tetraédrico
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de Dados de Proteínas)
MD	Dinâmica molecular
QM	Mecânica Quântica
MM	Mecânica Molecular

SM	Semiempírico
$K_i$	Constante de inibição
STO	Função de base do tipo Slater
GTO	Função de base do tipo Gaussiana
$K_D$	Constante de dissociação do complexo enzima-reativador
$K_R$	Constante de dissociação do complexo enzima inibida-reativador
$k_R$	Constante de velocidade de reativação de primeira ordem
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$K_i$	Constante de inibição
WHO	World Health Organization
LD <sub>50</sub>	Lethal Dose, 50% (Dose letal para 50% da população)

### LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
$\Psi$	Ângulo psi
$\Phi$	Ângulo phi
$\mu\text{M}$	Micromolar
K	Kelvin
nm	Nanômetro
ns	Nanossegundos
mg	Miligramas
kg	Kilogramas
$\text{K}^+$	Íon Potássio

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1	Armas químicas e biológicas: histórico.....	24
2.2	Acetilcolinesterase.....	26
2.3	Acetilcolina.....	31
2.4	Hidrólise da acetilcolina.....	32
2.5	Inibidores da acetilcolinesterase.....	36
2.5.1	Organofosforados (OP).....	36
2.5.2	Carbamatos (CB).....	38
2.6	Inibição da acetilcolinesterase.....	41
2.7	Envelhecimento da acetilcolinesterase .....	43
2.8	Reativação da acetilcolinesterase .....	44
2.9	Oximas.....	46
2.10	Química computacional medicinal .....	51
2.11	Modelagem molecular.....	52
2.12	Ancoramento molecular.....	55
2.13	Os métodos híbridos – QM/MM.....	57
3	OBJETIVOS.....	61
4	METODOLOGIA.....	62
4.1	Metodologia geral .....	62
4.1.1	Dados biológicos.....	62
4.1.2	Cálculo de ancoramento molecular.....	65
4.1.3	Cálculo do mecanismo de reação.....	66
4.2	Metodologia de estudo para o sistema 1: <i>Mm</i> AChE inibida por ciclosarin.....	66
4.3	Metodologia de estudo para o sistema 2: <i>Hs</i> AChE inibida por ciclosarin.....	68
4.4	Metodologia de estudo para o sistema 3: <i>Mm</i> AChE inibida por carbofuran.....	70
4.5	Metodologia de estudo para o sistema 4: <i>Hs</i> AChE inibida por carbamato.....	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.1	<i>Mm</i> AChE inibida por ciclosarin.....	74
5.1.1	Ancoramento molecular.....	74
5.1.2	Mecanismo de reação.....	83
5.2	<i>Hs</i> AChE inibida por ciclosarin.....	86
5.2.1	Ancoramento molecular.....	86
5.2.2	Mecanismo de reação.....	97
5.3	<i>Mm</i> AChE inibida por carbofurano.....	105

5.3.1	Ancoramento molecular.....	105
5.3.2	Mecanismo de reação.....	115
5.4	<i>HsAChE</i> inibida por carbofurano.....	116
5.4.1	Ancoramento molecular.....	117
5.4.2	Mecanismo de reação.....	126
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
	REFERÊNCIAS.....	131
	ANEXOS.....	143

## 1 INTRODUÇÃO

Os agentes de guerra química e biológica constituem uma classe de armas não convencionais, de mais baixo custo, mais difícil detecção e capazes de causar uma destruição de vidas sem precedentes na história da humanidade, além de terem um alto potencial para uso por parte de grupos terroristas independente do seu tamanho ou importância militar. O uso deste tipo de arma se dá desde a antiguidade por diversos povos, mas teve seu maior desenvolvimento durante a Primeira Guerra Mundial, onde passaram a ser utilizadas em larga escala. O químico alemão Fritz Harber participou ativamente no desenvolvimento das armas químicas neste período (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010).

Antes da Segunda Guerra, foram desenvolvidos outros agentes com maior potencial tóxico, mais letais e capazes de matar em poucos minutos, os neurotóxicos, em especial os compostos organofosforados (OP). Compostos semelhantes foram desenvolvidos para uso como pesticidas na agricultura, seja organofosforados ou carbamatos (CB), os quais são muito difundidos e empregados até os dias de hoje. Esses compostos são chamados agentes dos nervos por agirem no sistema nervoso central e periférico. Os neurotóxicos são inibidores potentes da AChE, a enzima responsável por realizar a hidrólise da ACh, e conseqüentemente, realizar a terminação da transmissão dos impulsos nervosos. O acúmulo de ACh leva à chamada Síndrome Colinérgica, caracterizada por uma série de sintomas, sendo um deles a depressão do centro respiratório, podendo levar à morte em poucos minutos dependendo do grau de intoxicação.

O processo de inibição da AChE por um agente organofosforado pode ser revertido antes da etapa chamada de envelhecimento, na qual a enzima fica inibida de forma irreversível. A inibição da AChE pode ser revertida por um

agente nucleófilo por meio da desfosforilação da Ser203 do sítio ativo da AChE, liberando a enzima reativada. Neste sentido, as oximas pirimidínicas são compostos nucleofílicos capazes de retirar o neurotóxico do sítio ativo, e assim reativar a enzima. Porém a eficiência destas oximas ainda é limitada, pois uma oxima eficiente contra um agente neurotóxico, pode ser completamente inútil contra outro, seja organofosforado ou carbamato, e seu mecanismo de reação ainda não é completamente elucidado.

Embora existam programas de defesa contra armas químicas, ainda existem grandes estoques destas armas em diversos países, sendo que elas constituem, portanto, uma ameaça real, justificando a busca e o desenvolvimento de compostos mais eficientes contra os neurotóxicos, em especial os organofosforados. Além disso, o grande número de casos de intoxicação por pesticidas OP e CB, como por exemplo, o CB aldicard conhecido como “chumbinho” atrai bastante atenção. A química medicinal computacional contribui de forma significativa nesses estudos, tendo em vista a dificuldade de se testar esses compostos em humanos, a economia de investimentos com reagentes e materiais e principalmente o ganho de tempo na busca por uma oxima universal.



## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Armas químicas e biológicas: histórico**

No final da Primeira Grande Guerra, a utilização de agentes químicos, resultou em aproximadamente 100 mil mortes e 1,3 milhões de feridos (GONÇALVES, 2009). Apesar de armas químicas serem utilizadas desde a antiguidade, pode-se dizer, na verdade, que a guerra química moderna teve início na Primeira Guerra Mundial (1915), quando os alemães utilizaram o gás cloro contra as tropas aliadas na Bélgica (SIDELL; TAKAFUJI; FRANZ, 1997). Esse acontecimento levou ao desenvolvimento das primeiras máscaras contra gases, e conseqüentemente, ao surgimento de novos agentes mais tóxicos e cujas propriedades físico-químicas dificultassem a sua retenção nas máscaras. Entre as décadas de 30 e 50, pesquisadores alemães, por meio de uma síntese muito simples, desenvolveram uma nova classe de agentes químicos de toxidez muito maior que a dos agentes conhecidos anteriormente. Esta nova classe de compostos é chamada de neurotóxicos, pois agem no sistema nervoso. São compostos organofosforados similares aos usados como pesticidas na agricultura, porém mais tóxicos (GONÇALVES, 2009).

Os organofosforados, conhecidos como agentes dos nervos, são compostos químicos com bastante significância militar. Eles são inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (AChE), extremamente tóxicos (PATOČKA et al., 2005) e inibem a atividade da AChE nas sinapses depositando um grupo fosforil no seu sítio ativo, resultando no acúmulo de ACh e ativação descontrolada das sinapses colinérgicas (EDDELSTON et al., 2002).

Atualmente, uma grande preocupação em relação à guerra química diz respeito aos agentes neurotóxicos inibidores da AChE, incluindo inseticidas organofosforados, carbamatos, haletos de sulfonila, proteínas naturais do grupo

da fasciculina e outros inibidores sintéticos reversíveis altamente específicos (GONÇALVES, 2009). Apesar dos esforços intensivos por parte da comunidade internacional, culminando com a Convenção sobre Armas Químicas que entrou em vigor em 1997, OPs altamente tóxicos são armazenados por diferentes países e representam uma ameaça potencial para as forças militares, e como demonstrou claramente a guerra Irã-Iraque, os agentes OP representam uma ameaça ainda maior à população civil. Dois incidentes de uso de neurotóxicos por terroristas contra civis em Tóquio, em meados dos anos noventa, demonstram a necessidade do desenvolvimento e disponibilidade de medidas médicas eficazes contra toda a gama de agentes dos nervos (EYER; WOREK, 2007; WOREK et al., 2004, 2005). A Figura 1 mostra alguns dos principais neurotóxicos.

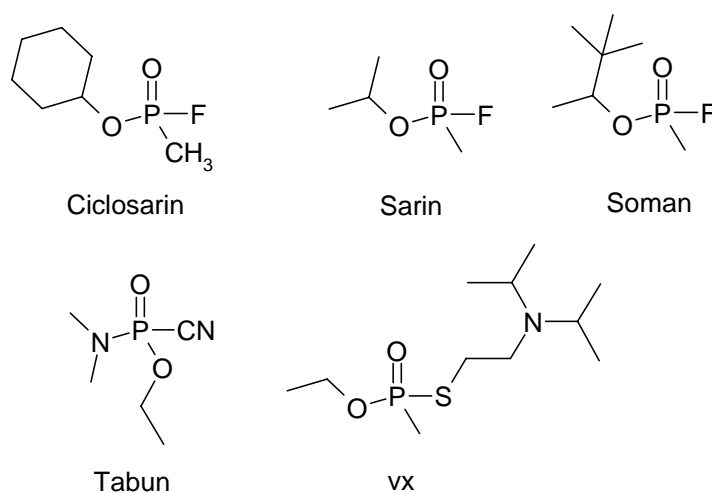


Figura 1 Estruturas de alguns agentes dos nervos (compostos organofosforados)

O tratamento contra envenenamento por organofosforados envolve a tentativa de reduzir a absorção com lavagem gástrica, ou algumas substâncias para conter os efeitos do OP absorvido (EDDELSTON et al., 2002). Tratamentos padrão incluem um antagonista muscarínico, como por exemplo, atropina, e um reativador da AChE (uma oxima).

Apesar disso, considera-se que, uma das deficiências atuais da defesa química militar é a limitada eficácia dos antídotos disponíveis contra os agentes dos nervos, da classe de inibidores neurotóxicos que possui maior toxidez, tais como o sarin e o tabun (GONÇALVES, 2009).

Além do uso como agentes de guerra química, há também a utilização extensiva de organofosforados e carbamatos como pesticidas para controle de pragas, e até mesmo o uso frequente em tentativas de suicídio, fazendo com que ocorra em todo o mundo, um grande número de intoxicações e centenas de milhares de mortes por ano. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1990), já estimou que cerca de 200.000 pessoas são envenenadas por pesticidas a cada ano, mas ainda assim, o uso desses compostos para desenvolvimento da agricultura do mundo é necessário e muito difundido (EDDELSTON et al., 2002).

## **2.2 Acetilcolinesterase**

A AChE ou acetilcolina acetil-hidrolase, 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).

A AChE está presente nos sistemas nervosos central e periférico, sobre o receptor de ACh na transmissão de impulsos nervosos através das sinapses neuromusculares, promovendo a destruição hidrolítica da ACh catiônica. Ela está entre as enzimas mais eficientes, com rendimento em torno de  $10^4 \text{ s}^{-1}$  (QUINN, 1987) sendo capaz de rapidamente hidrolisar a ACh nas junções neuromusculares e nas sinapses colinérgicas no cérebro (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; SOREQ et al., 1990). A eficiência catalítica da AChE e sua alta reatividade com vários inibidores covalentes e não covalentes são determinadas pela arquitetura funcional única do sítio ativo da AChE (ORDENTLICH et al., 1996; SHAFFERMAN et al., 2005). Na Figura 2 está representada a estrutura tridimensional da AChE.

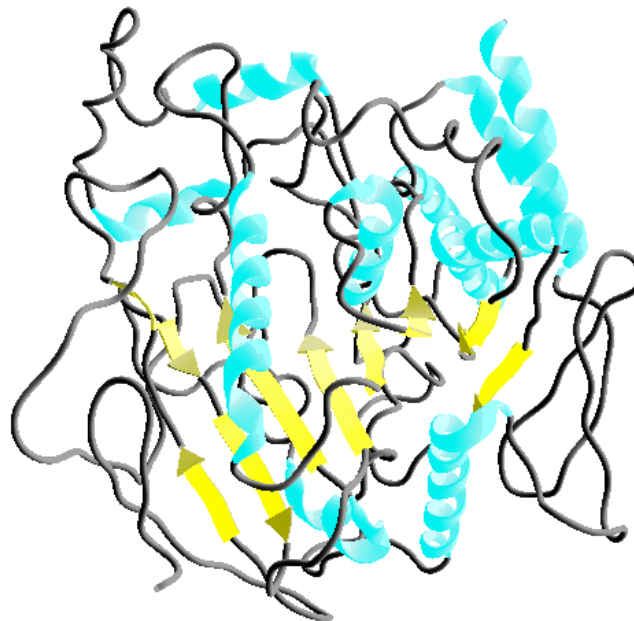


Figura 2 Estrutura tridimensional da *HsAChE* obtida do PDB (Código: 3LII). Em verde estão representadas as  $\alpha$ -hélices, em amarelo as folhas  $\beta$  e em cinza as alças

As colinesterases definem uma família de serina hidrolases, dentro da superfamília das  $\alpha/\beta$  hidrolases (NARDINI; DIJKSTRA, 1999). As  $\alpha/\beta$  hidrolases têm uma habilidade de fornecer um arcabouço estável de sítios ativos de uma ampla variedade de enzimas, sendo que a tríade catalítica, altamente conservada, é formada por um nucleófilo (serina, cisteína ou ácido aspártico), um resíduo ácido e um resíduo de histidina (NARDINI; DIJKSTRA, 1999). A AChE é uma enzima fundamental no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados (com sistema nervoso organizado), e está relacionada à doenças como Alzheimer e Parkinson, dentre outras doenças degenerativas (GIACOBINI, 2004). Além disso, ela é a enzima alvo de agentes de guerra química como os compostos organofosforados.

A resolução da estrutura tridimensional, modelagem molecular, aliados aos estudos cinéticos da AChE com substratos e inibidores reversíveis (BARAK et al., 1994; GIBNEY et al., 1990; ORDENTLICH et al., 1993a, 1993b, 1995; SHAFFERMAN et al., 1992), constituem o início da elucidação do papel funcional dos vários subsítios da enzima i) o subsítio que contém a serina; ii) o subsítio aniônico Trp86(84); iii) o hidrofóbico incluindo Trp86, Tyr337 e Phe338; e iv) o núcleo acil, Phe295 e Phe297. A maior contribuição desses últimos três subsítios parece estar relacionada com a estabilização do complexo de Michaelis-Menten. A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) somente se aproxima da constante de dissociação real em complexos não covalentes (ORDENTLICH et al., 1996). O fenômeno de saturação demonstrado pela inibição do sítio ativo na AChE por uma variedade de compostos OP, indica um complexo intermediário não covalente no processo de fosforilação. A formação de cada complexo de Michaelis é seguida por uma reação nucleofílica da serina, resultando numa espécie tetraédrica (ALDRIDGE; REINER, 1972; MAIN, 1976). Nessas reações a configuração tetraédrica de inibidores OP proporciona uma dimensão a mais na sondagem da organização espacial do sítio ativo da

AChE. Além disso, como na fosforilação, a constante de dissociação do complexo de Michaelis para o conjugado enzima-OP pode ser cineticamente estimada, desde que nenhum outro complexo enzima-inibidor seja formado, (interação no sítio periférico, por exemplo) (FRIBOULET 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 3), sendo que no primeiro encontram-se os resíduos de histidina e serina da tríade catalítica (Ser203, His447, e Glu334), 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, onde 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. Esta é a principal função dos resíduos de Trp (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. Este 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.

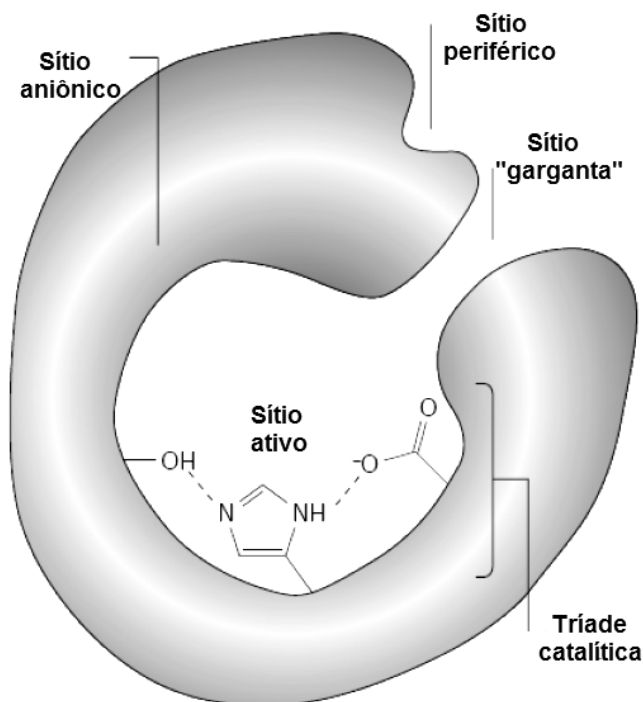


Figura 3 Sítio ativo da AChE (OBREGON, 2001)

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., 2003; GONÇALVES, 2009; PATOČKA et al., 2005). Estes quatro domínios atuam de forma concertada, resultando nas reações com uma cinética complexa que caracterizam a AChE (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987; SHAFFERMAN et al., 2005).

Estudos da AChE por raios X demonstram o seu sítio catalítico ativo, como uma cavidade estreita e profunda, de aproximadamente 20 Å e que penetra até a metade da enzima. O sítio ativo está localizado a cerca de 4 Å da base desta cavidade, que é revestida de 14 resíduos aromáticos (cerca de 40% do interior da

superfície interna da cavidade) (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; PATOČKA et al., 2005; SHAFFERMAN et al., 2005), os quais desempenham claramente um importante papel na estabilização do complexo enzima-substrato, por meio de efeitos estéricos e hidrofóbicos (BERMAN; LEONARD, 1990; HAREL et al., 1993; PATOČKA et al., 2005).

Como já foi mencionado, 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 da doença de Parkinson (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987).

### **2.3 Acetilcolina**

A ACh é um neurotransmissor e tem um papel importante na transmissão dos impulsos nervosos em todo o sistema nervoso, pois se não houver uma pausa da transmissão nervosa em determinados instantes, poderá ocorrer uma super transmissão desses impulsos, gerando consequências drásticas como batimento cardíaco e respiração irregulares e até uma parada respiratória, podendo levar o indivíduo à morte devido à chamada Síndrome Colinérgica (GONÇALVES, 2009).

A ACh se difunde pelas sinapses e se liga nos receptores colinérgicos e muscarínicos, os quais dentre outras funções, servem como portões de íons para a entrada de  $K^+$  dentro do processo pós-sináptico do nervo ou célula muscular (QUINN, 1987).

Os agentes dos nervos são substâncias químicas consideradas tóxicas, pois eles produzem efeitos biológicos por meio da inibição da AChE, impedindo a hidrólise da ACh (EYER; WOREK, 2007; SIDELL, 1992). A inabilidade da AChE inibida em hidrolisar a ACh, causa um acúmulo do neurotransmissor, e conseqüentemente a super estimulação dos receptores colinérgicos. Dependendo



do tipo e da dose do neurotóxico incorporada, ocorrem distúrbios de numerosas funções tais como, a paralisia das funções neuromusculares e, finalmente, parada respiratória e morte (EYER; WOREK, 2007; WOREK et al., 2004). O acúmulo de ACh leva ainda a persistente estimulação de receptores muscarínicos, que provocam sintomas que incluem secreção abundante, broncoespasmo, hipotensão arterial e diarreia. Efeitos relacionados ao sistema nervoso central incluem também ansiedade, agitação, confusão, ataxia, tremores, convulsões, paralisia cardiorrespiratória e coma (ALBUQUERQUE et al., 2006).

Felizmente, a AChE age hidrolisando a ACh, regulando a transmissão dos impulsos nervosos no organismo e mantendo o seu funcionamento equilibrado (GONÇALVES, 2009).

#### **2.4 Hidrólise da acetilcolina**

A literatura sugere que a ACh interage com a AChE por uma ligação iônica com um glutamato e uma ligação hidrogênio com uma tirosina. Os resíduos de histidina e serina, no sítio catalítico, participam do mecanismo de hidrólise. Uma das propostas conhecidas para o mecanismo de hidrólise pela AChE está no fato da histidina agir como um catalisador ácido/base durante todo o mecanismo, enquanto a serina funciona como nucleófilo (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987).

A ACh se aproxima do sítio ativo da AChE, e sofre um ataque nucleofílico da serina na carbonila do éster. Para estabilizar a carga positiva do oxigênio da serina, a histidina captura o próton desse oxigênio, agindo como uma base, como mostra a Figura 4 (OBREGON, 2006).

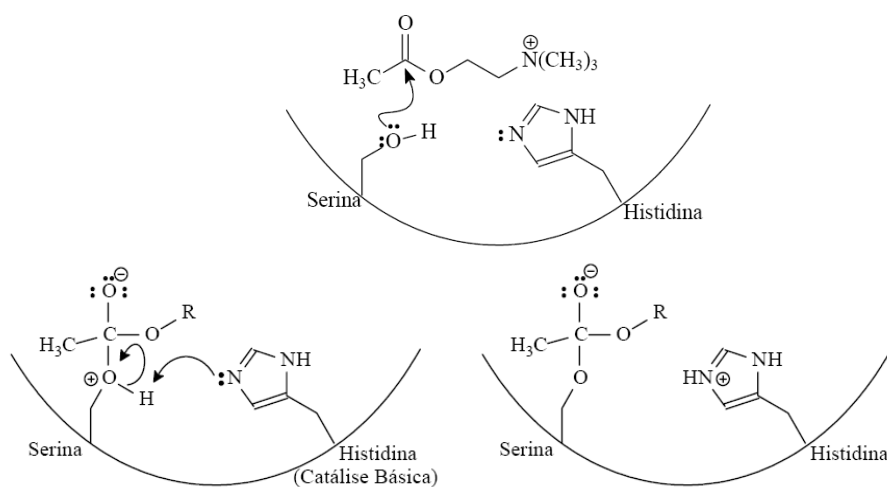


Figura 4 Hidrólise da ACh pela AChE

Para promover a protonação da função éster do intermediário, tornando-o um bom grupo de saída, a histidina realiza uma catálise ácida. Assim o grupo carbonila é restaurado e a colina é liberada. Em seguida, uma molécula de água realiza um ataque nucleofílico no grupamento acetila, e a colina que foi liberada já pode ser recuperada e reutilizada na biossíntese de novas moléculas de ACh. (Figura 5).



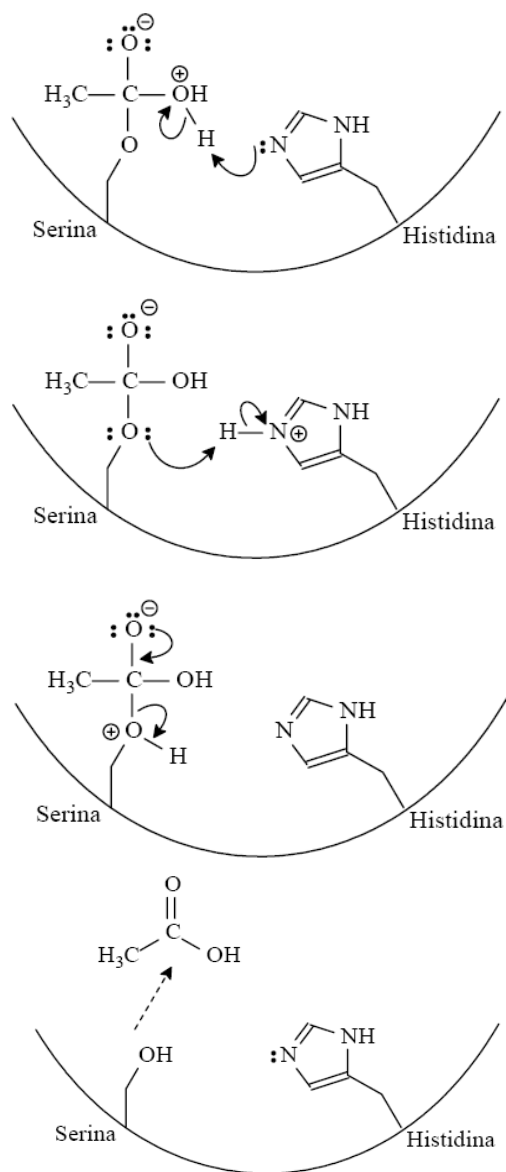


Figura 6 Hidrólise da ACh pela AChE (continuação)

O nucleófilo está sempre localizado numa curva bastante acentuada chamada “cotovelo nucleofílico”, onde ele pode facilmente ser abordado pelo substrato, ou por uma molécula de água hidrolítica. Isto induz a serina a adotar ângulos de torção desfavoráveis energeticamente e impõe restrições espaciais sobre os resíduos localizados em sua proximidade (NARDINI et al., 1999). A serina por si só é incapaz de hidrolisar um éster, porém, com a ajuda do resíduo de histidina, o único resíduo da tríade catalítica conservado, isso se torna viável (GONÇALVES, 2009; NARDINI et al., 1999).

## **2.5 Inibidores da acetilcolinesterase**

Os inibidores mais comuns da AChE são os OPs e CBs, os quais apresentam um variado grau de toxicidade em humanos (CASARETT; KLASSEN; DOULLS, 1996). Como já mencionado, esses compostos passaram a ser usados como armas químicas e na agricultura principalmente depois da II Guerra Mundial, e atualmente mais de 200 OPs diferentes, e mais de 25 CB são produzidos mundialmente (OBREGON, 2006; SINGH et al., 1995).

### **2.5.1 Organofosforados (OP)**

Pouco antes da II Segunda Guerra Mundial surgiram os neurotóxicos ou compostos organofosforados (FRANÇA; SILVA; CASTRO, 2010; GONÇALVES, 2009), que são inibidores irreversíveis da AChE e muito tóxicos, e dependendo da dose podem levar à morte (PATOČKA et al., 2005). A estrutura geral dos OP está representada na Figura 7, sendo que R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são grupos aril ou alquil ligados diretamente ao átomo de fósforo, e X pode ser representado por diversos grupos: halogênio, alifático, aromático ou heterociclo e está diretamente ligado ao fósforo.

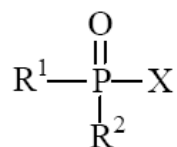


Figura 7 Estrutura geral dos compostos OP

Os agentes conhecidos como sarin, soman e tabun ficaram muito conhecidos pelo seu uso como agentes de ataques terroristas, como aconteceu em 19 de março de 1995, no metrô de Tóquio no Japão, com o gás sarin (MUNRO et al., 1999; SHIH; KAN; MCDONOUGH, 2005). O sarin (isopropil metilfosfofluoridato - I), o tabun (etil N,N-dimetil fosforamidocianidato – II), o soman (pinacolil metilfosfofluoridato – III) e o ciclosarin (cicloexil metilfosfofluoridato – IV) são exemplos de alguns dos mais importantes agentes dos nervos utilizados como armas químicas (Figura 8) (OBREGON, 2006; SHIH; KAN; MCDONOUGH, 2005).

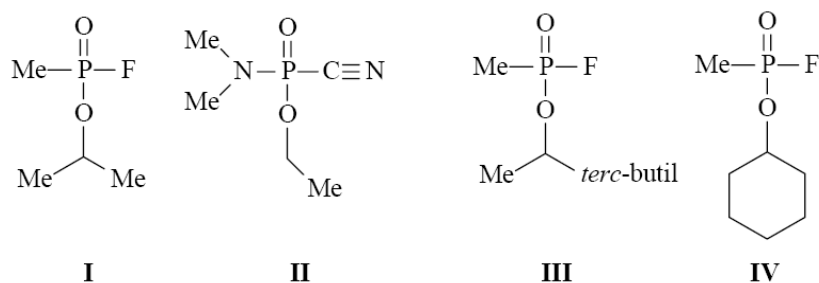


Figura 8 Exemplos de agentes usados em guerra química

### 2.5.2 Carbamatos (CB)

Os OPs e os CBs são os mais importantes inibidores da AChE e por isso, chamados de agentes anticolinesterase. Como já mencionado, a presença destes compostos impede a enzima de hidrolisar a ACh, que em excesso, causa uma síndrome colinérgica. O envenenamento por CB se manifesta por uma crise colinérgica clinicamente indistinguível do envenenamento por OP (ROSMAN, 2009).

Os compostos derivados do ácido carbônico são provavelmente os compostos com maior faixa de atividade (KUHR; DOROUGH, 1976; OBREGON, 2006). Na sua estrutura básica (Figura 9), R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são usualmente substituintes orgânicos, podendo ser também átomos de hidrogênio. O substituinte R<sub>3</sub> é geralmente um substituinte orgânico ou um metal, e o grupo X é um oxigênio, ou em alguns casos, um átomo de enxofre (OBREGON, 2006; SOBORG; VILANOVA, 2002).

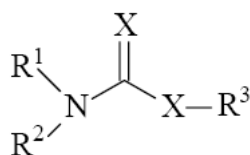


Figura 9 Estrutura geral dos carbamatos

Os exemplos de CBs inseticidas mais conhecidos são os compostos Aldicarb, Carbaril, Carbofurano e Primicarb (Figura 10).

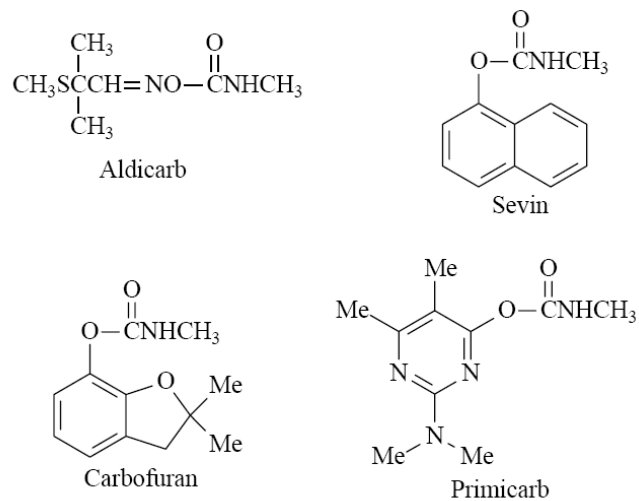


Figura 10 Estrutura de alguns CBs mais comuns



A Tabela 1 resume os principais inseticidas CBs, classificados de acordo com sua toxicidade relativa.

Tabela 1 Os principais inseticidas CBs em uso e sua potência tóxica relativa (valores estimados em humanos).

<b>Alta Toxicidade</b> <b>(LD<sub>50</sub> &lt; 50 mg/kg)</b>	<b>Toxicidade Moderada</b> <b>(LD<sub>50</sub> entre 50 e 200</b> <b>mg/kg)</b>	<b>Baixa Toxicidade</b> <b>(LD<sub>50</sub> &gt; 50 mg/kg)</b>
Aldicarbe (Temik)	Bufencarbe (Bux)	BPMC (Fenocarb)
Aldoxicarbe (Standak)	Carbosulfano	Carbaril (Sevin)
Aminocarbe (Metacil)	Pirimicarbe (Pirimor)	Isoprocarbe (Etrofolan)
Bendiocarbe (Ficam)	Promecarbe	MPMC (Meobal)
Carbofurano (Furadan)	Tiodicarbe (Larvin)	MTMC (Metacrate, Tsumacide)
Dimetilano (Snip)	Trimetacarbe (Broot)	XMC (Cosban)
Dimetano (Dimetan)		
Dioxacarbe (Eleocron, Famid)		
Formetanate (Carzol)		
Metiocarbe (Mesurol)		
Metomil (Lannate, Nudrin)		
Oxamil (Vydate)		
Propoxur (Baygon)		

(ERDMAN, 2003; ROSMAN, 2009).

Alguns CBs podem ter propriedades terapêuticas, como por exemplo, a neostigmina e a piridostgmina, análogos do alcaloide natural fisostigmina, a miotina e derivados e a galantamina, que é utilizada no tratamento da doença de Alzheimer (BAR-ON et al., 2002; WEINSTOCK et al., 1986).

## 2.6 Inibição da acetilcolinesterase

Alguns OPs e CBs, por formarem um conjugado de fósforo covalentemente ligado ao resíduo catalítico Ser203, interferem no mecanismo catalítico da AChE. Estes compostos impedem a hidrólise da ACh, obstruindo a transmissão colinérgica (GONÇALVES et al., 2006; HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; QUINN, 1987). A Figura 11 mostra o mecanismo de inibição da AChE por um OP.

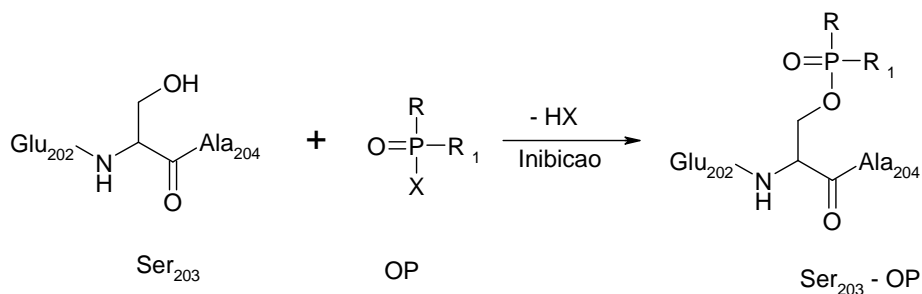


Figura 11 Esquema da inibição da AChE por OP, sendo, R o grupo alquil, O- alquil ou amida; R<sub>1</sub> o grupo O-alquil ou amida; e X o grupo abandonador HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007).

Semelhante aos OPs, os CBs imitam a ação da ACh, ligando-se ao sítio ativo da enzima. Porém, no caso dos carbamatos, o grupo hidroxil do resíduo de serina do sítio catalítico, promove um ataque nucleofílico ao grupo carbonil do CB. Entretanto, a ligação CB-AChE não é tão estável quanto a que é formada após uma inibição por OP, assim a reativação espontânea ocorre depois de algum tempo (hidrólise lenta). (ERDMAN, 2003; ROSMAN, 2009). Os efeitos clínicos dependem da dose, do tipo de carbamato e da via de contaminação (BRANCH, 1986; DICKOFF; GERBER; TUROVSKY, 1987; ROSMAN, 2009; UMEHARA et al., 1991; WESSELING et al., 2002; YANG et al., 2000).

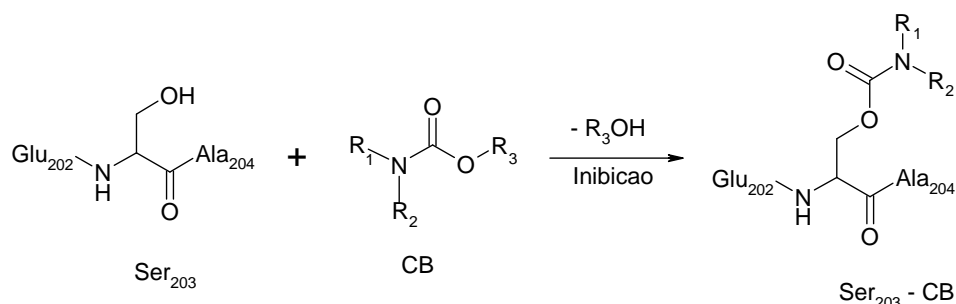


Figura 12 Esquema de inibição da AChE por CB sendo, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> grupos orgânicos

Os princípios básicos dos procedimentos em caso de intoxicação por CB incluem a remoção da fonte de exposição, medidas de suporte (oxigenação, controle das vias aéreas, assistência respiratória etc), descontaminação, controle das crises e administração de antídotos (ROSMAN, 2009). O tratamento padrão emprega um antagonista muscarínico, e um reativador da AChE (uma oxima).

## 2.7 Envelhecimento da acetilcolinesterase

Após a inibição da AChE por OP, podem acontecer dois processos: o envelhecimento ou a reativação espontânea da enzima (Figura 13), que pode ser acelerada por várias ordens de grandeza pela adição de um nucleófilo forte como uma oxima (WOREK et al., 2004). No entanto, a reação de reativação para a maioria dos complexos AChE-OP, sem a presença de oximas, ocorre a uma taxa insignificante, sendo portanto a reação de envelhecimento majoritária (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007).

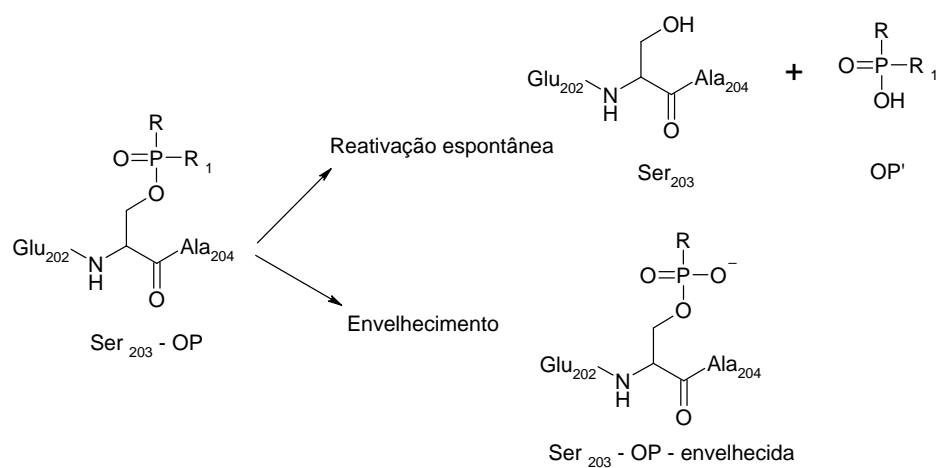


Figura 13 Esquema da Reativação espontânea e do Envelhecimento, sendo, R o grupo alquil, O-alkil ou amida; R1 o grupo O-alkil ou amida (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007)

O processo de envelhecimento ocorre por 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 a reação de reativação baseada em oximas conhecidas atualmente, ou seja, uma enzima inibida irreversivelmente (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007; WOREK et al., 2004). A enzima inibida por CB não sofre o processo de envelhecimento, como acontece com o complexo AChE-OP (ROSMAN, 2009).

## **2.8 Reativação da acetilcolinesterase**

A fim de contrariar os efeitos tóxicos dos OP e CB, medidas terapêuticas adicionais são indispensáveis. A desfosforilação ou descarbamilação da serina do sítio ativo da AChE é chamada reativação, e é considerado o principal mecanismo de ação das oximas. A porção do nitrogênio aromático positivamente carregado da molécula de oxima é atraída pelo sítio aniônico da AChE, permitindo assim, que a parte ativa da oxima se posicione sobre o sítio carbamilado ou fosforilado da AChE, e promova o ataque nucleofílico (DICKOFF; GERBER; TUROVSKY, 1987; ROSMAN, 2009). Recentes dados clínicos de pacientes intoxicados por pesticidas organofosforados fornecem fortes evidências para a validade desta hipótese (WOREK et al., 2004). O complexo AChE-OP pode ser revertido com a introdução de um reativador de AChE (PATOČKA et al., 2005; QUINN, 1987), e a reação de reativação da AChE-OP pode ser observada na Figura 14 enquanto que a reativação da AChE-CB é mostrada na Figura 15.

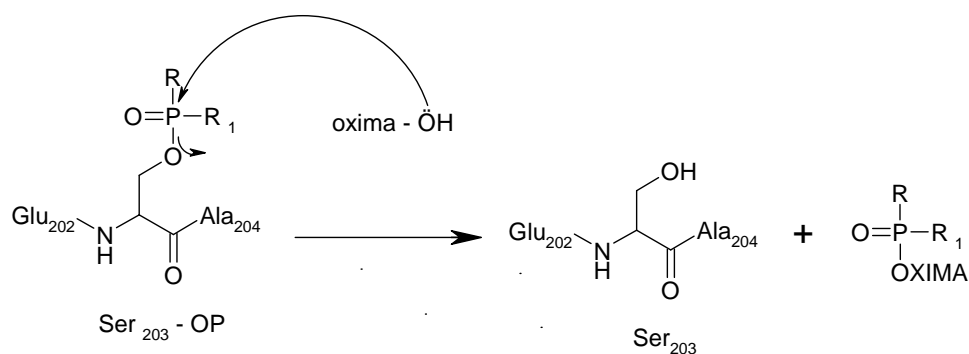


Figura 14 Reação de reativação do conjugado AChE-OP por uma oxima, sendo R o grupo alquil, O-alquil ou amida; R<sub>1</sub> o grupo O-alquil ou amida

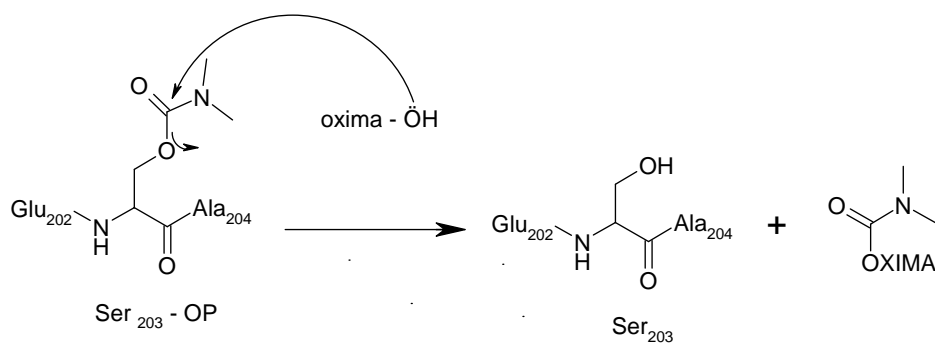


Figura 15 Reação de reativação do conjugado AChE-CB por uma oxima

O tratamento do complexo AChE-OP com antídotos médicos baseados em oximas, ou reativadores, pode, em muitos casos, restaurar a função da enzima inibida. A reativação pelo uso de oximas se baseia na capacidade de remover o fosforil da parte do sítio ativo, ou no caso de intoxicação por CB, remover o carbonil (DICKOFF; GERBER; TUROVSKY, 1987; ROSMAN, 2009). Por isso, espera-se o uso dessas oximas de forma a atuar como antídotos

específicos, ou seja, antes do envelhecimento da enzima inibida (EYER; WOREK, 2007; GONÇALVES et al., 2006; HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007).

Porém, 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 uma alta resistência a reativação, enquanto que os complexos formados com VX, sarin podem ser reativados por uma série de diferentes reativadores. Além da distorção estrutural da His447, que rompe a tríade catalítica na AChE inibida por tabun não envelhecida, o conjugado com tabun induz a distorção da lateral do Phe338 para uma posição estreita da garganta do sítio ativo. Análises cristalográficas adicionais da interação entre a oxima HI-6 e a AChE não fosforilada têm mostrado que a mudança estrutural do resíduo Phe338 no complexo AChE-tabun, é provavelmente perturbada pelo sítio de ligação da HI-6. Esta interação implica na distorção do resíduo Phe338 observada na estrutura não envelhecida do conjugado AChE-tabun, contribuindo para a alta resistência dos conjugados com tabun à reativação (HÖRNBERG et al., 2007). As cinéticas tanto da reação de inibição como da reativação, são altamente dependentes da estereoquímica dos OP (HÖRNBERG; TUNEMALM; EKSTRÖM, 2007).

## 2.9 Oximas

A busca por reativadores baseados em oximas remonta a 1950. Até 1951, a atropina parecia ser o único antídoto disponível para o tratamento de casos de envenenamento com OPs, até que Jandorf deu o primeiro passo para solucionar este problema, mostrando que a hidroxilamina poderia destruir OP *in vitro* (os primeiros estudos começaram com a hidroxilamina e ácido

hidroxâmico). Estes resultados inspiraram a tentativa de adicionar hidroxilamina em AChE inibida por tetraetilpirofosfato *in vitro*, obtendo o primeiro resultado de sucesso conhecido de reativação de AChE fosforilada anteriormente irreversível (STOJILJKOVIĆ; JOKANOVIĆ, 2006). Em 1955, as oximas foram descobertas como antídotos específicos mais eficientes que as hidroxilaminas (EYER; WOREK, 2007; STOJILJKOVIĆ; JOKANOVIĆ, 2006). As estruturas de algumas oximas estão representadas na Figura 16, as quais foram abordadas neste estudo.

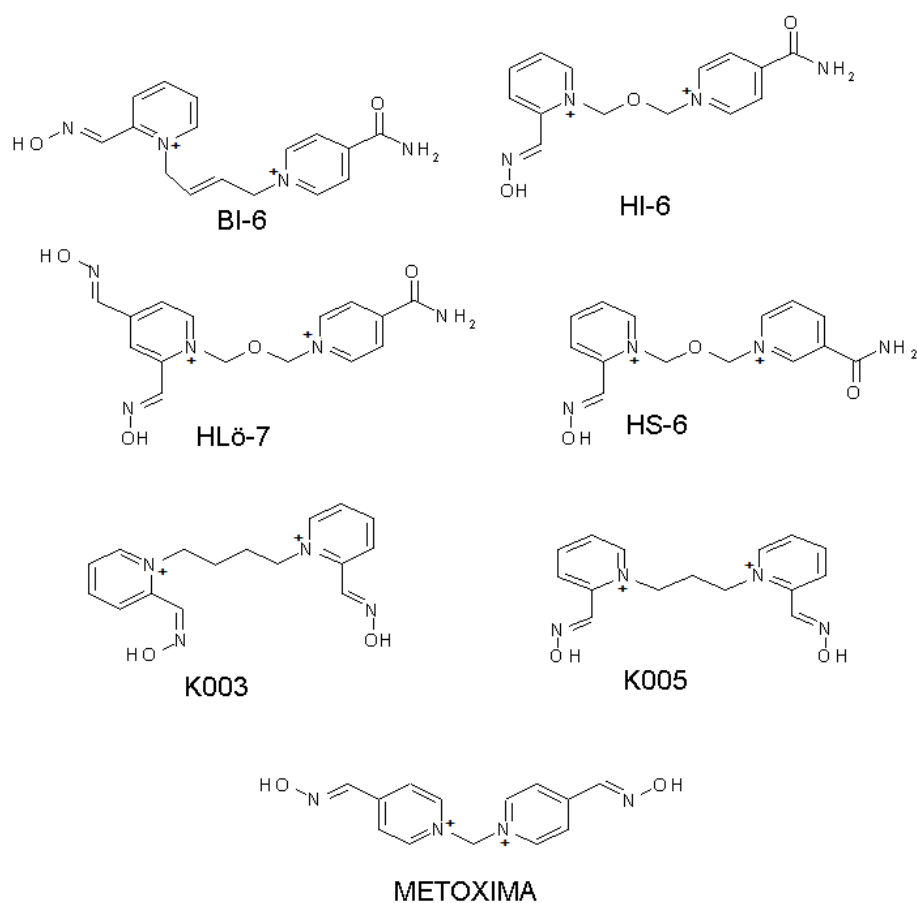


Figura 16 Estrutura das oximas em estudo com atividade conhecida como reativadores de AChE-ciclosarin, descritas por Kassa et al. (2007)



Mais de 1.500 compostos foram testados, mas poucos são os que foram estudados para o uso humano, pois uma das grandes desvantagens no desenvolvimento de oximas como antídotos contra o envenenamento por agentes de nervos, é a dificuldade em realizar estudos clínicos em seres humanos. Portanto, diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* são utilizados para estimar a eficácia das oximas (EYER; WOREK, 2007). Entretanto, um dos principais problemas na avaliação da eficácia das oximas em seres humanos é a dificuldade de extrapolar os dados dos animais para seres humanos (WOREK & EYER, 2007).

As oximas têm sido então, investigadas por muitos anos como compostos com alto potencial contra o envenenamento por OPs, incluindo pesticidas e agentes dos nervos, contudo, atualmente poucas oximas (como TMB-4, PAM-2, HI-6 e a obidoxima) possuem aplicação clínica. Além disto, elas ainda apresentam desvantagens de potência limitada na reativação de AChE na intoxicação por tabun e algumas apresentam toxicidade pronunciada (EYER; WOREK, 2007; KOVARIK et al., 2008). A pralidoxima foi a primeira oxima eficaz usada em intoxicação por OP em humanos.

É preciso considerar ainda, que a AChE não permanece para sempre suscetível de ser reativada por uma oxima, pois, o complexo enzima-inibidor pode sofrer a reação de desalquilação característica do “envelhecimento” dependendo da estrutura química do inibidor, tornando impossível a reativação da enzima após essa transformação (HOBBIGER, 1955; STOJILJKOVIĆ; JOKANOVIĆ, 2006).

Numerosos estudos têm investigado o mecanismo de ação das oximas nas últimas décadas, e há evidências convincentes da ação das oximas, principalmente como reativadores de AChE (ECKERT et al., 2008; EYER; WOREK, 2007). O processo de reativação acontece via duas etapas de reação. Primeiro há a formação de um complexo totalmente reversível AChE-fosfil (no



2006). Atualmente, diferentes sais de pralidoxima, obidoxima, TMB-4 e HI-6 são usados como antídotos contra o envenenamento por OPs e vários países estão em um processo para substituir pralidoxima ou obidoxima por HI-6 (EYER; WOREK, 2007).

Outra oxima importante é a HLö-7, nomeado em homenagem a Ilse Hagedorn e Marianne Löffle que a sintetizaram em Freiburg, Alemanha, em 1986. Essa oxima reativa a AChE inibida por qualquer um dos quatro agentes dos nervos mais potentes (sarin, soman, tabun, e VX), bem como a enzima inibida pelo ciclosarin, embora tenha demonstrado ser mais tóxica. Na escala de eficácia, a HLö-7 revelou-se um pouco mais eficaz do que a HI-6 contra o envenenamento por tabun e VX e menos eficaz contra o envenenamento por sarin, soman, e ciclosarin (STOJILJKOVIĆ; JOKANOVIĆ, 2006).

Há também na literatura algumas discussões relacionadas ao uso de oximas no caso de intoxicação por inseticidas CB. Algumas controvérsias existem ainda quanto ao uso da oxima associada à atropina, o uso de atropina sozinha e até mesmo contra o uso de oximas (FARAGO, 1969). Porém muitos estudos sugerem que as oximas aumentam a toxicidade do CB apenas no caso de intoxicação por carbaril, e os efeitos variam com o tipo de oxima utilizada, com a dose ministrada e o protocolo de tratamento (CARPENTER, 1961; HARRIS et al., 1989; LIESKE et al., 1992; NATOFF; REIFF 1973; SANDERSON, 1961; STERRI et al., 1979). Inversamente, outros resultados mostram que o uso de oximas é eficiente contra intoxicação por outros CB (MERCURIO-ZAPPALA et al., 2007), e há vários casos relatados em que o uso de oximas em pacientes intoxicados por CB foi benéfico (BURGESS; BERNSTEIN; HURLBUT, 1994; EKINS; GELLER 1994; NELSON et al., 2001). Neste sentido, a química medicinal computacional aplicada aos estudos do uso de oximas como antídotos contra intoxicações por OP e CB, pode ajudar a esclarecer as questões citadas acima.

## 2.10 Química computacional medicinal

A química medicinal tem um papel importante no planejamento de candidatos a novos fármacos e fundamenta-se no conhecimento prévio dos processos envolvidos e na seleção de um alvo terapêutico adequado. Utilizando várias estratégias, envolve o trabalho de identificação, seleção e otimização de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (LOMBARDINO; LOWE, 2004). As pesquisas na área de química medicinal computacional ou modelagem molecular têm como objetivo desenvolver novos fármacos e contribuir no combate a doenças como o HIV, Tuberculose, Alzheimer e Câncer, mas pode ter também outras finalidades, como por exemplo, o melhoramento de compostos ativos contra agentes de guerra química ou pesticidas. Esta área de pesquisa é de grande importância para a sociedade e o mercado, pois pode ocorrer uma economia de tempo e dinheiro investido na produção e introdução de um novo reativador de AChE mais eficiente no mercado.

De fato, com o avanço e sofisticação da informática nos últimos anos, grandes quantidades de informações têm sido cada vez mais rapidamente processadas, e, com o auxílio de novas ferramentas e metodologias computacionais, resultados melhores e mais precisos vêm sendo obtidos na tentativa de simular uma variedade de parâmetros químicos e correlações. Uma das grandes vantagens dos métodos computacionais é o seu baixo custo frente a métodos experimentais, uma vez que evitam repetição de análises e reações, além de gastos com reagentes e materiais, visto que simulações podem ser feitas para otimizar e compreender processos, reações, interações intra e intermoleculares, etc. A aplicação de métodos computacionais para solucionar problemas químicos estende-se às áreas onde a química desempenha um importante papel, direto ou indireto.

## 2.11 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 (CARVALHO et al., 2003; SANT'ANNA, 2002).

Um estudo das relações estrutura-atividade de um composto-protótipo e de seus análogos pode ser usado para determinar as partes da estrutura do protótipo que são responsáveis por sua atividade biológica e também por seus efeitos adversos. Subsequentemente, esta informação é usada para desenvolver um novo composto que possui a atividade aumentada, poucos efeitos colaterais indesejáveis e maior facilidade de administração (THOMAS, 2003).

As moléculas, geralmente desenhadas de forma tridimensional não estão, necessariamente, na conformação mais estável. Durante a geração de uma determinada estrutura ocorrem distorções na molécula com formação desfavorável de comprimentos e ângulos de ligações e ângulos diédricos. Átomos não-ligados também interagem em uma mesma região do espaço e provocam repulsão estérica e eletrostática. Para corrigir estas distorções as moléculas são otimizadas pelo processo de minimização de energia, a partir de dois modelos matemáticos (i) mecânica molecular ou (ii) mecânica quântica. Interações não previsíveis, relacionadas à sobreposição de orbital molecular, distribuição de densidade eletrônica, ou interferências estéricas podem ser solucionadas pelos métodos computacionais. A minimização de energia e a análise conformacional são usadas interativamente, para otimizar a geometria de uma molécula (CARVALHO et al., 2003; PATRICK; FLANAGAN, 2001).

O processo de mecânica molecular promove a modificação dos ângulos e comprimentos das ligações dos átomos originais e fornece novas conformações

com os correspondentes cálculos de energia. O programa reconhece as mudanças que conduzem a estruturas mais estáveis, de menor energia estérica e os cálculos são interrompidos quando as modificações da estrutura mais estável, em relação à molécula original, não resultam em alteração considerável de energia. O objetivo da mecânica molecular é predizer a energia associada com determinada conformação de uma molécula (CARVALHO et al., 2003; PATRICK; FLANAGAN, 2001).

Na minimização, os cálculos de energia estérica são interrompidos quando a molécula atinge a primeira conformação estável e levam a uma estrutura semelhante à original com energia mínima local. Nesta fase, a minimização não prossegue porque variações na estrutura resultam em mudanças pequenas de energia. A Figura 18 mostra que esta conformação “estável” pode estar separada de outra, ainda mais estável, por uma barreira de energia que o algoritmo de minimização é incapaz de sobrepujar. Neste caso, para identificar a conformação mais estável, com uma energia mínima global, é necessário gerar várias conformações de uma molécula e comparar os valores de energias obtidos a cada modificação (CARVALHO et al., 2003; FOYE; LEMKE; WILLIAMS, 1995; GRINGAUZ, 1997; KUMOSINSKI; LIEBMAN, 1994).

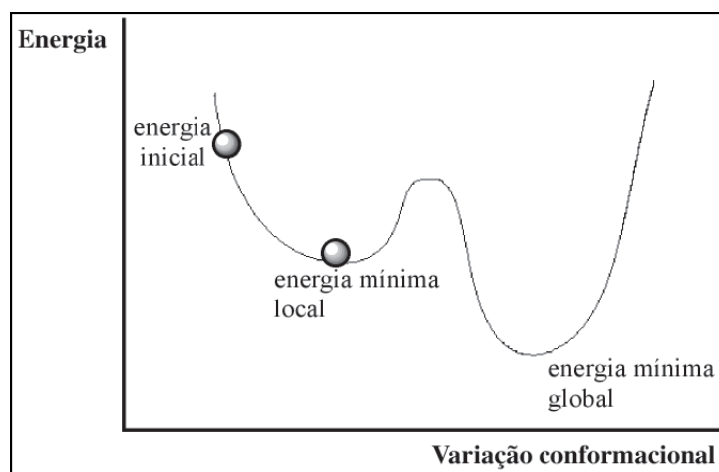


Figura 18 Variação da energia com a variação conformacional

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

Os modelos moleculares gerados pelo computador são resultantes de equações matemáticas que estimam as posições e propriedades dos elétrons e núcleos, e os cálculos realizados exploram, de forma experimental, as características de uma estrutura fornecendo uma molécula sob nova perspectiva (CARVALHO et al., 2003).

Para entender o mecanismo de interação de um fármaco é essencial saber o posicionamento tridimensional para a sua interação molecular com a proteína alvo. A predição da geometria e da energia de ligação é de grande interesse para o planejamento de novos medicamentos (HILLISCH et al., 2004). Uma das conformações estruturais mais confiáveis é obtida por análise de raios-X de cristais do complexo, mas não é fácil obter dados experimentais sobre todos os compostos de interesse. 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). Este tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante 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 enorme (MIZUTANI; NIWA; TANAKA, 1994).

Uma maneira interessante de pesquisar a estrutura mais estável do complexo (não necessariamente o mínimo global) foi proposta por Kuntz, Blaney e Oatley (1982). A ideia fundamental inicial desse método é representar ambos, a molécula ligante e a superfície macromolecular, por um conjunto de esferas (método estocástico) e procurar qual o melhor emparelhamento das esferas. A complementariedade da forma molecular é muito importante no método de ancoramento. Posteriormente, um método mais eficiente para o acoplamento molecular de ligantes flexíveis foi desenvolvido por Leach e Znojil (1992). O método consiste em primeiro determinar a posição e a orientação dos fragmentos rígidos do ligante e então pesquisar as conformações da região flexível do ligante de modo sistemático. A energia de interação intermolecular é calculada pela soma das contribuições de energia entre todos os átomos das duas moléculas desconsiderando as interações entre os átomos da mesma molécula.

## **2.12 Ancoramento Molecular**

Cada ligante é ancorado no sítio ativo da enzima. Nesta etapa, a identificação dos modos de interação do ligante é interativa avaliando um número de soluções (conformação e orientação do ligante) e estimando a



energia de suas interações com a proteína. As melhores soluções são retornadas para uma análise adicional.

Os valores da função de desempenho do Ancoramento (*Docking Scoring Function*),  $E_{score}$  são definidos pela eq. 1:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

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

O termo de  $E_{PLP}$  é um potencial “piecewise linear” 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 em quilocalorias por mol (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

$E_{intra}$  é a energia interna do ligante:

$$E_{intra} = \sum_{i=ligant} \sum_{j=ligant} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{flexiblebonds} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad \text{Eq.3}$$

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à torção da energia, onde  $\theta$  é o ângulo de torção da ligação. A

média da contribuição de torção da ligação da energia é usada se diversas torsões são determinadas. O último termo,  $E_{clash}$ , 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, estas funções são usadas para sobrepor automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde rígida (proteína).

### 2.13 Os métodos híbridos – QM/MM

Devido ao grande número de átomos em proteínas e ao fato de reações envolverem a quebra e 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 nesta metodologia, primeiramente, introduzida por Levitt e colaboradores (WARSHEL; LEVITT, 1976) pode ser descrita da seguinte forma: assume-se que o sistema molecular pode ser dividido em dois subsistemas, região QM e MM. 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).

Um método para se obter os resultados de QM é o de funcional de densidade (Density Functional Theory, DFT). A formulação do método ficou a cargo de Hohenberg, Kohn e Sham (KOHN; HOLTHAUSEN, 2001). Segundo Ziegler (1991) a noção básica em DFT, de que a energia de determinado sistema eletrônico possa ser expressa em função de sua densidade, é quase tão antiga

quanto a própria mecânica quântica. Hohenberg e Kohn mostraram também que a energia, função de onda e outras propriedades moleculares são equivocadamente determinadas por essa densidade de probabilidade eletrônica  $\rho$  [x,y,z] (segundo teorema de Hohenberg-Kohn), ou seja, a densidade eletrônica e o Hamiltoniano têm uma relação funcional que permite a computação de todas as propriedades moleculares no estado fundamental sem uma função de onda. Mas esses teoremas não mencionam como encontrar a energia do estado fundamental a partir de  $\rho$  ou a partir de  $\psi$ . Este problema foi contornado por Kohn e Sham na década de 60 quando eles propuseram que a energia puramente eletrônica de uma molécula com muitos elétrons no estado fundamental seria dada pela Eq.4:

$$E_o = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \Psi_i(\mathbf{1}) | \nabla_1^2 | \Psi_i(\mathbf{1}) \rangle - \sum_{\alpha} \int \frac{Z_{\alpha\rho}(\mathbf{1})}{r_{1\alpha}} d\nu_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{1})\rho(\mathbf{2})}{r_{12}} d\nu_1 d\nu_2 + E_{xc}[\rho] \quad \text{Eq.4}$$

Onde  $\Psi_i(\mathbf{1})$ ,  $i=1, 2, \dots, n$  são os orbitais Kohn-Sham, e  $E_{xc}[\rho]$  é a energia de troca e correlação, Kohn e Sham também mostraram que “ $\rho$ ” exato para o estado fundamental pode ser determinado pelos orbitais  $\Psi_i$  (Eq.5):

$$\rho = \sum_{i=1}^n |\Psi_i|^2 \quad \text{Eq.5}$$

O terceiro teorema de Hohenberg-Kohn diz que  $E_0[\rho] \leq E_0[\rho']$ , onde  $\rho$  é a densidade exata e  $\rho'$  a densidade aproximada pela expansão (Eq.5) para “n” finito. Este teorema é equivalente ao teorema variacional de Hartree-Fock

Os orbitais Kohn-Sham podem ser determinados pela expressão (Eq.6):

$$\hat{F}_{KS}(\mathbf{1})\Psi_i(\mathbf{1}) = \varepsilon_{i,KS\Psi_i}(\mathbf{1}) \quad \text{Eq.6}$$

Onde  $\hat{F}_{KS}$  é o operador de Kohn-Sham apresentado pela equação (Eq.7):

$$\hat{F}_{KS} = -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_a \frac{Z_\alpha}{r_{1\alpha}} + \sum_{j=1}^n J(\mathbf{1}) + V_{xc}(\mathbf{1}) \quad \text{Eq.7}$$

Onde o potencial  $V_{xc}$  é a principal diferença entre os métodos Hartree-Fock e DFT (MORGON; CUSTÓDIO, 1995).

Desta forma, pode-se minimizar a energia em relação à densidade através das condições de contorno (Eq.8):

$$\frac{\partial E_0}{\partial \rho} = 0 \quad \text{Eq.8}$$

sendo a integral  $\rho' dr = N$ , onde N é o número de elétrons do sistema.

O principal problema do método é a falta de um processo sistemático para determinar  $E_{xc}[\rho]$ . Assim, vários tipos de funcionais já foram propostos (LEVINE et al., 1991). Este funcional é, na realidade, dividido em duas partes: uma de troca e outra de correlação. Um dos funcionais de troca mais utilizados é o B3 proposto por Becke (1993), que utilizamos neste trabalho (Eq.9):

$$E_x = (1 - a_0)E_x^{LSDA} + a_0 E_x^{HF} + a_x \Delta E_x^{B88} \quad \text{Eq.9}$$

Para correlação foi utilizado o funcional proposto por Lee, Yang e Parr (LEE; CHUNG, 2009) (Eq.10):

$$E_c = -a \int \frac{1}{1+d\rho^{\frac{1}{3}}} \left\{ \rho + b\rho^{\frac{-2}{3}} \left[ C_{F\rho^{\frac{5}{3}}} - 2t_w + \left( \frac{1}{9}t_w + \frac{1}{18}\nabla^2\rho \right) \right] \exp\left(-c\rho^{\frac{-1}{3}}\right) \right\} dr \quad \mathbf{Eq.10}$$

A partir daí conceitos importantes na descrição teórica das reações químicas, tais como potencial químico e conceito de dureza e moleza (*hardness* e *softness*, são incorporados na DFT uma vez que  $\rho(\mathbf{r})$  e o número de elétrons  $N$  podem ser relacionados mais facilmente que as funções de onda de muitos elétrons.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é a descrição, em nível molecular, das interações entre um conjunto de oximas e a AChE, em diferentes sistemas:

- 1- *Mm*AChE e *Hs*AChE inibidas pelo OP ciclosarin;
- 2- *Mm*AChE/*Hs*AChE inibidas pelo CB carbofurano;

Além disso, empregar técnicas híbridas (QM/MM), que permitam o estudo do mecanismo de reativação de oximas, nos quatro sistemas diferentes no intuito de avaliar quais são os fatores estruturais e eletrônicos que governam os parâmetros cinéticos e termodinâmicos do processo de reativação.

## **4 METODOLOGIA**

Para melhor entender a metodologia, ela foi dividida em geral e específica para cada um dos quatro sistemas estudados (*MmAChE-OP*, *HsAChE-OP*, *MmAChE-CB* e *HsAChE-CB*).

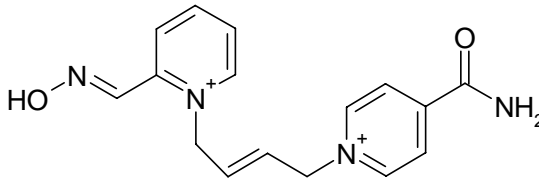
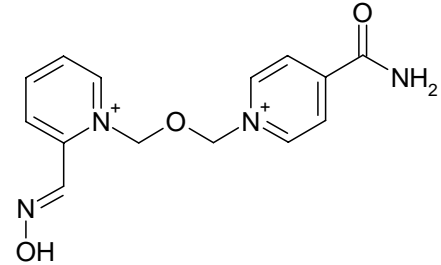
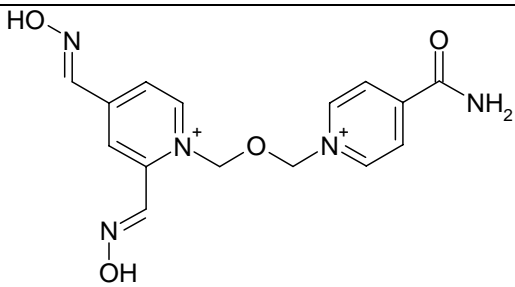
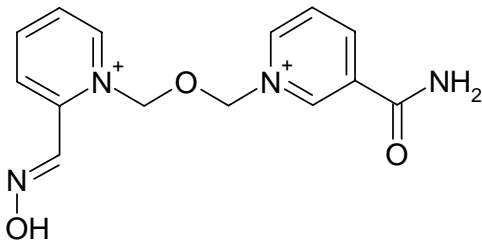
### **4.1 Metodologia geral**

A metodologia geral e específica para cada um dos sistemas estudados é descrita abaixo.

#### **4.1.1 Dados biológicos**

A primeira etapa realizada foi a busca na literatura por algumas oximas que apresentavam valores experimentais para a AChE inibida por ciclosarin. Estas oximas e seus respectivos dados experimentais estão apresentados na Tabela 2.

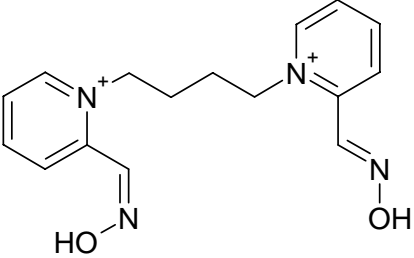
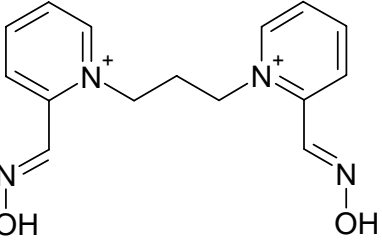
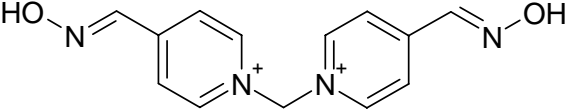
Tabela 2 Estruturas dos reativadores de AChE e seus respectivos valores experimentais das constantes de dissociação do complexo reativador-enzima inibido por ciclosarin (KASSA et al., 2007).

REATIVADOR	ESTRUTURA	$K_R$ ( $\mu\text{M}$ )
BI-6		100000
HI-6		12
HLö-7		1000
HS-6		45

continua



Tabela 2, Continuação

REATIVADOR	ESTRUTURA	$K_R$ ( $\mu\text{M}$ )
K033		20
K005		5
Metoxima		15

**Nota:**  $K_R$  – constante de dissociação do complexo reativador-enzima inibida.

Após a seleção dos reativadores para posterior construção das moléculas, fez-se uma busca pela estrutura cristalográfica da AChE inibida pelo ciclosarin depositada no “*Protein Data Bank*” - PDB PDB (2011), para fazer o ancoramento desses reativadores na enzima inibida.

Neste trabalho, utilizou-se o método QM/MM e o método ONION, que podem ser aplicados no desenvolvimento de um modelo para simulação da reação entre as oximas e a enzima inibida por ciclosarin ou por carbofurano, possibilitando estudos por QM/MM. Nesses estudos, tratamos quanticamente os

átomos constituintes da oxima e do inibidor que estão diretamente envolvidos no mecanismo de reação e também dos átomos mais próximos, e classicamente a tríade catalítica da AChE, e alguns outros aminoácidos pertencentes ao sítio ativo e ao restante da enzima. A parte MM foi obtida principalmente dos resultados dos estudos por ancoramento molecular. A conformação dos reativadores e dos resíduos de aminoácidos da AChE inibida obtida do ancoramento, foi recortada de forma a deixar somente a parte que será utilizada nos cálculos de QM e ONION. Esta metodologia sequencial de cálculo tem sido validada para mecanismos de reações e obtenção de propriedades espectroscópicas (RAMALHO; CUNHA; ALENCASTRO, 2004; RAMALHO et al., 2007, 2009, 2010; RAMALHO; TAFT, 2005).

#### **4.1.2 Cálculo de ancoramento molecular**

As estruturas dos inibidores foram construídas por meio do programa *PC Spartan Pro* (HEHRE; DEPPMEIER; KLUNZINGER, 1999) e as cargas parciais atômicas foram calculadas utilizando o método semiempírico AM1. Esse procedimento é necessário para obter as conformações iniciais dos compostos, importantes para o estudo de ancoramento molecular.

O programa utilizado para o ancoramento foi o *Molegro Virtual Docker* (MVD) um programa que permite determinar a conformação mais provável do ligante na enzima. A identificação da conformação do ligante é feita por meio da avaliação de um número de candidatos (conformações dos ligantes) estimando as energias de suas interações com a enzima. Os complexos foram construídos no programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Nesta etapa, a identificação dos modos de interação do ligante é interativa avaliando um número de soluções (conformação e orientação do ligante) e estimando as

energias de suas interações com a proteína. As melhores soluções são retornadas para uma análise adicional.

#### 4.1.3 Cálculo do mecanismo de reação

Os cálculos de mecanismo de reação e ONION foram efetuados nos programas *PC Spartan Pro* (HEHRE; DEPPMEIER; KLUNZINGER, 1999) e *Gaussian 98* (FRISCH et al., 2001). A região QM do mecanismo de reação consiste dos resíduos da tríade catalítica, dos resíduos que realizaram interações de hidrogênio com a oxima, ligações peptídicas vizinhas, átomos ligados e cofator. Todos os estados de transição, intermediários e precursores envolvidos foram calculados e a caracterização desses estados de transição foi feita por meio dos cálculos de frequência imaginária. Para os cálculos de ONION, o sistema usado no mecanismo de reação, foi dividido em região MM e região QM. A região QM consiste dos átomos constituintes da oxima e do inibidor, que estão envolvidos diretamente no mecanismo de reação e também dos átomos mais próximos, e a região MM consiste do restante do sistema. Cada confôrmero foi totalmente otimizado em ambos os níveis, AM1 e DFT, com gradiente de conjugação e algoritmos quasi-Newton-Raphson. A geometria final foi obtida com o funcional de densidade Becke's e o gradiente funcional corrigido de Lee, Yang e Paar (B3LYP) (LEE; CHUNG, 2009) usando a base 6-311G (d).

#### 4.2 Metodologia de estudo para o sistema 1: *MmAChE* inibida por ciclosarin

As coordenadas cristalográficas da *MmAChE* fosforilada por sarin e complexada com a oxima HI-6 (PDB código: 2WHP) com resolução de 2.20Å, foram retiradas do *Protein Data Bank* (PDB, 2011) e tiveram suas moléculas de água cristalográficas removidas no software SPDBViewer (GUEX, 1997). A

estrutura do sarin dentro da AChE foi completada por meio da introdução do grupo  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  usando o software *Spartan08*<sup>®</sup> (HEHRE; DEPPMEIER; KLUNZINGER, 1999), afim de se obter a estrutura 3D da AChE fosforilada por ciclosarin necessária para o desenvolvimento dos estudos do presente trabalho. As estruturas 3D de cada inibidor mostradas na Figura 16 foram construídas com base na estrutura do HI-6 na sua conformação bioativa. Os compostos foram ancorados dentro do sítio de ligação da *Mm*AChE usando o MVD<sup>®</sup> (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Os sítios de ligação foram restringidos dentro de esferas com raio de 5 a 15 Å, de acordo com o tamanho do ligante, centralizadas na HI-6 complexada no sítio da proteína, incluindo todos os resíduos do sítio ativo. Devido à natureza estocástica do algoritmo de busca do ancoramento ligante-proteína, cerca de 10 corridas foram realizadas e 30 soluções de *docking* foram retidas para cada ligante. As poses com melhor sobreposição em relação a HI-6 foram escolhidas para a análise realizada neste trabalho.

Os cálculos do mecanismo de reação foram desenvolvidos nos pacotes *Spartan08*<sup>®</sup> (HEHRE; DEPPMEIER; KLUNZINGER, 1999) e *Gaussian98* (FRISCH et al., 2001). Todos os estados de transição, intermediários e precursores envolvidos foram calculados. No programa *Gaussian98* foram realizados os cálculos seguindo a metodologia ONION, onde a região MM é constituída pelos resíduos de Phe338, Phe295, Tyr124, Arg296, Trp286, Thr83, Tyr337, Tyr341, Ser298, Thr83 e Glu285, além da tríade catalítica e do reativador, na esfera com raio de 9 a 15 Å, respectivamente, centrada em cada oxima. A região QM consistiu dos átomos constituintes da oxima e do inibidor, que estavam envolvidos diretamente no mecanismo de reação e também dos átomos mais próximos.

### 4.3 Metodologia de estudo para o sistema 2: *HsAChE* inibida por ciclosarin

As coordenadas cristalográficas da *HsAChE* nativa (PDB código: 3LII), com resolução 3.20 Å, foram retiradas do *Protein Data Bank* (PDB, 2011) e tiveram suas moléculas de água cristalográficas removidas no software SPDBViewer (GUEX, 1997). A enzima *MmAChE* fosforilada por sarin e complexada com a oxima HI-6 (PDB código: 2WHP), tendo o sarin modificado e usada no estudo do Sistema 1, foi utilizada para copiar as coordenadas cristalográficas do ciclosarin e da oxima HI-6 para a *HsAChE*, uma vez que as duas enzimas possuem 88,5% de identidade homológica e sítios ativos muito semelhantes. As enzimas foram sobrepostas e colocadas nas mesmas coordenadas no programa SPDBViewer (GUEX, 1997). Essa alta porcentagem de identidade homológica sugere que os resultados experimentais da *MmAChE* podem ser extrapolados para a *HsAChE*. Na Figura 19 é possível ver o alinhamento da sequência primária no formato FASTA entre as enzimas 2WHP (*MmAChE*) e 3LII (*HsAChE*), realizado a partir do site ExPasy (<http://au.expasy.org>). A ligação covalente entre o ciclosarin e o resíduo de Ser203 do sítio ativo da enzima foi feita no Discovery Studio (DISCOVERY STUDIO, 2009). Dessa forma foi possível obter a enzima AChE humana inibida por ciclosarin, necessária para a realização dos estudos de *docking* e mecanismo de reação, seguindo o mesmo procedimento realizado para o sistema 1. A região MM no sistema 2 consiste dos resíduos de Asp74, Tyr72, Ser125, Ans87, Tyr124, Tyr337, Arg296, Tyr341, Phe295, Ser293 e Gln71, além da tríade catalítica, e a região QM consistiu dos átomos constituintes da oxima e do inibidor, que estavam envolvidos diretamente no mecanismo de reação e também dos átomos mais próximos.

```

      10      20      30      40      50      60
HuAChE EDAELLVTVRCGRLRGIRLKTPGCGPVSAFLGIPFAEPPMCPRRFLPPEPKQPWSGVDAT
      . . . . .
MmAChE EDPQLLVVRGGQLRGIRLKAPGGPVSAFLGIPFAEPPVCSRRRMPPEPKRRPWSGVLDAT
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
HuAChE TFQSVCYQYVDTLYPGFEGTEHWMPNRELSEDCLYLMVWTPYPRPTSPTPVLWVIYGGCF
      . . . . .
MmAChE TFQNVCYQYVDTLYPGFEGTEHWMPNRELSEDCLYLMVWTPYPRPASPTPVLIWVIYGGCF
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
HuAChE YSGASSLDVYDGRFLQAERTVLVSMNYRVGAFGFLALPGSREAPGNVLLDQRLALQWV
      . . . . .
MmAChE YSGAASLDVYDGRFLQAVEGAVLVSMNYRVGTFGFLALPGSREAPGNVLLDQRLALQWV
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
HuAChE QENWAAFCGDPTSVTLFGESAGAASVGMHLLSPPSRGLFHRAVLQSGAPNGCPWATVCMCE
      . . . . .
MmAChE QENLAAFCGDPMSVTLFGESAGAASVGMHLLSPSRSLFHRAVLQSGTPNGCPWATVSAGE
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
HuAChE ARRRATQLAHLVGCPPGCTGCNDTELVACLRTRPAQVLVNHEWHVLPQESVFRFSFVPPV
      . . . . .
MmAChE ARRRATLLARLVGCPPGCAGCNDTELIACLRTRPAQDLVDHEWHVLPQRSIFRFSFVPPV
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
HuAChE DGDFLSDTPEALINAGDFHGLQVLVGVWKDEGSYFLVYCAPGFSKDNESLISRAEFLAGV
      . . . . .
MmAChE DGDFLSDTPEALINTGDFQDLQVLVGVWKDEGSYFLVYCVPGFSKDNESLISRAQFLAGV
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
HuAChE RVCVPQSDLAAEAVVLHYTDWLHPEDPARLREALSDVGDHNVVCPVAQLAGRLAAQGA
      . . . . .
MmAChE RIGVPQSDLAAEAVVLHYTDWLHPEDTHLRDAMSAVVGDHNVVCPVVAQLAGRLAAQGA
      370     380     390     400     410     420

      430     440     450     460     470     480
HuAChE RVYAYVFEHRASTLSWPLWMGVPHCYIEFIFGIPLDPSRNYTAEKKIFAQRLMRYWANF
      . . . . .
MmAChE RVYAYIFEHRASTLTWPLWMGVPHCYIEFIFGLPLDPSLWYTEBRIFAQRLMKYWTNF
      430     440     450     460     470     480

      490     500     510     520     530     540
HuAChE ARTGDPNEPDPKAPQWPPYTAGAQQYVSLDLRPLEVRRGLRAQACAFWNRFLPKLSAT
      . . . . .
MmAChE ARTGDPNDPDSKSPDWPPYTAAQQYVSLMLKPLEVRRGLRAQTCAFWNRFLPKLSAT
      490     500     510     520     530     540

```

Figura 19 Alinhamento da sequência dos resíduos das enzimas *HsAChE* e *MmAChE*. Os resíduos de aminoácidos em azul são idênticos, em vermelho são semelhantes e os resíduos em preto não apresentam identidade significativa

#### 4.4 Metodologia de estudo para o sistema 3: *Mm*AChE inibida por carbofurano

As coordenadas cristalográficas do CB Ganstigmina, cristalizado na AChE de *Torpedo Californica* (*Tc*AChE) com código PDB: 2BAG e resolução de 2.40 Å, retiradas do *Protein Data Bank* (PDB, 2011), foram copiadas e coladas na mesma enzima utilizada no estudo do Sistema1, a *Mm*AChE (PDB código: 2WHP), depois que as duas enzimas foram sobrepostas e colocadas nas mesmas coordenadas pelo programa SPDBViewer (GUEX, 1997). Esse procedimento só foi possível de ser realizado porque as enzimas *Tc*AChE e *Mm*AChE possuem 58,6% de identidade homológica, e possuem sítios ativos muito semelhantes. O alinhamento da sequência primária no formato FASTA entre as enzimas *Tc*AChE e *Mm*AChE, realizado a partir do site Expsy (BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL, 2011), pode ser observado na Figura 20.

```

      10      20      30      40      50      60
MmAChE EDPQLLVRVRGGQLRGI RLKAPGGPVSAFLGIPFAEPPVGSRRFMPPEPKRPWSGVLDAT
      . . . . .
TcAChE DHSELVNTKSGKVMGTRV PVLSSHISAF LGIPFAEPPVGNMRRFRPEPKRPWSGVWNAS
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
MmAChE TFQNVCIYQYVDITLYPGFE GTEMWNP NRELSEDCLYLN VWTIPYRPA SPTPVL IWIYGGGF
      . . . . .
TcAChE TYPNQCQQYVDEQFPGFSG SEMWNP NREMS EDCLYLN I WVPSPR PKSTT-VMV WIYGGGF
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
MmAChE YSGAASLDVYDGRFLAQV EGA VLVS MN YRVGTFGFLALPGS REAPGNVGLLDQR LALQWV
      . . . . .
TcAChE YSGSSITLDVYNGKYLAYT EEVVLVSLSYRVGAFGFLALHGS QEAPGNVGLLDQR MALQWV
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
MmAChE QENIAAFGGDPM SVTLFGESAGAA SVGMHILSLPSRSLFHRAVLQSGT PNGPWATV SAGE
      . . . . .
TcAChE HDNIQFFGGDPKTVTI FGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCPWASVSVVAE
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
MmAChE ARRRATLLARLVGCP PPGGAGNDTELIACLRT RPAQDLVDHEWHVLPQES IFRFSFVPV
      . . . . .
TcAChE GRRRAVELGRNLNC----NLNS DEELIHCLREKKPQELI DVEWNVLPFDS IFRFSFVPVI
      250     260     270     280     290

      310     320     330     340     350     360
MmAChE DGDFLSDTPEALINTGDF QDLQVLVGVVKDEGS YFLVYGVPGFSKDNES LISRAQFLAGV
      . . . . .
TcAChE DGEFFPTSL ESM LNSGNFKKTQ ILLGVNKDEGS FFLLYGAPGFSKDS ESKISREDFMSGV
      300     310     320     330     340     350

      370     380     390     400     410     420
MmAChE RIGVPAQASDLAAEAVV LH YTDWLHPEDPTHLRDAMS AVVGDHNVVCPVAQLAGRLAAQGA
      . . . . .
TcAChE KLSVPHANDLGLDAVTLQ YTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFGN
      360     370     380     390     400     410

      430     440     450     460     470     480
MmAChE RVYAYIFEHRASLTW PLWGMVPHGYEIEFIFGLPLDPSLNYTTEERI FAQRLMKYWINF
      . . . . .
TcAChE GTYLYFFNHRASNLVWPEW MGVHGYEIEFVFG LPLVKE LNYTAE EALSRRIMHYWATF
      420     430     440     450     460     470

      490     500     510     520     530     540
MmAChE ARTGDPNDPRDSKSPQWFPYTTAAQQYVSLNLKPLEVRRGLRAQTCAFWNRF LPKLLSAT
      . . . . .
TcAChE AKTGNPNEPHSQES-KWPLFTTKEQKFIDLNTEPMKVHQLRVQM CVFWNQFLPKLLNAT
      480     490     500     510     520     530

MmAChE ATE
      .
TcAChE ACD

```

Figura 20 Alinhamento da sequência dos resíduos da *TcAChE* e da *MmAChE*. Os resíduos de aminoácidos em azul são idênticos, em vermelho são semelhantes e os resíduos em preto não apresentam identidade significativa



Com a *Mm*AChE contendo uma estrutura cristalizada de um CB, foi possível fazer o *docking* da estrutura do carbofurano no sítio ativo da enzima. A melhor conformação do carbofurano foi escolhida, levando-se em consideração a melhor sobreposição na estrutura do cristal de CB presente na enzima. A ligação covalente entre o carbofurano e o resíduo de Ser203 do sítio ativo da enzima foi feita no programa Discovery Studio (DISCOVERY STUDIO, 2009). Portanto, obteve-se a *Mm*AChE inibida pelo composto carbofurano e complexada com a HI-6, necessária para a realização dos estudos de *docking* e mecanismo de reação com as oximas em estudo, seguindo o mesmo procedimento realizado para o sistema 1.

Para os cálculos de ONION, a região MM nesta etapa do estudo (Sistema 3), consiste dos resíduos de Glu285, Tyr124, Gly122, Gly121, Trp286, Ser293, Tyr341, Glu202, Phe295, Arg296, Tyr337, Thr83, além da tríade catalítica, e a região QM composta pelos átomos constituintes da oxima e do carbofurano, que estão envolvidos diretamente no mecanismo de reação e também dos átomos mais próximos.

#### **4.5 Metodologia de estudo para o sistema 4: *Hs*AChE inibida por carbamato**

As coordenadas cristalográficas da *Hs*AChE nativa (PDB código: 3LII), com resolução 3.20 Å, foram retiradas do PDB (PDB, 2011) e tiveram suas moléculas de água cristalográficas removidas no software SPDBViewer (GUEX, 1997). A enzima *Mm*AChE carbamilada por carbofurano e complexada com a HI-6 (enzima utilizada nos estudos do sistema 3, ou seja *Mm*AChE inibida por carbofurano), foi utilizada para copiar as coordenadas do carbofurano e da HI-6 para a *Hs*AChE, uma vez que as duas enzimas possuem, como já foi mencionado, 88,5% de identidade homológica e sítios ativos muito semelhantes. As enzimas foram sobrepostas e colocadas nas mesmas coordenadas no

programa SPDBViewer (GUEX, 1997). A ligação covalente entre o carbofurano e o resíduo de Ser203 do sítio ativo da *HsAChE* foi feita no programa Discovery Studio (DISCOVERY STUDIO, 2009). Uma vez obtida a *HsAChE* inibida por carbofurano, realizou-se os estudos de *docking* e mecanismo de reação, seguindo o mesmo procedimento realizado para o sistema 1. Porém a região MM no sistema 4 é composta pelos resíduos de Asp74, Tyr72, Ser125, Ans87, Tyr124, Tyr337, Arg296, Tyr341, Phe295, Ser293 e Gln71, além da tríade catalítica, e a região QM consistiu dos átomos constituintes da oxima e do inibidor, que estavam envolvidos diretamente no mecanismo de reação e também dos átomos mais próximos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 *Mm*AChE inibida por ciclosarin

Os resultados de ancoramento molecular e mecanismos de reação para o sistema de *Mm*AChE inibida por ciclosarin estão descritos nos subitens abaixo.

#### 5.1.1 Ancoramento Molecular

Um algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa 3D foi usado para avaliar o sítio de ligação *Mm*AChE por meio do programa *MVD* (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O volume da cavidade foi de 175,10 Å<sup>3</sup> (Figura 21).

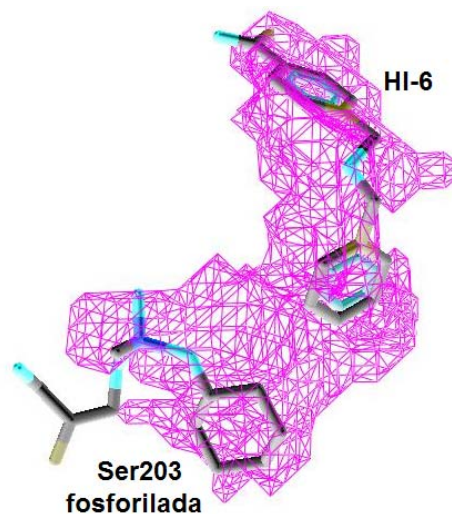


Figura 21 Cavidade (rosa) da *Mm*AChE, com a HI-6 e o ciclosarin ancorados. Para melhor visualização omitiu-se a proteína

Os resultados teóricos obtidos no ancoramento molecular das oximas na *Mm*AChE, foram avaliados e comparados com os resultados experimentais descritos por KASSA et al. (2007). As oximas em estudo foram ancorados no sítio ativo da *Mm*AChE baseando-se na oxima HI-6 obtida do PDB, cristalizada dentro da enzima. As energias de interação intermolecular ligante-proteína foram calculadas para melhor entender quais são as variações entre os modos de interação dos compostos no sítio ativo da enzima e verificar quais os fatores responsáveis pela atividade das oximas (Tabela 3).

Tabela 3 Valores da constante experimental de dissociação do complexo reativador-enzima inibida ( $pK_R = -\log K_R$ ,  $\mu\text{M}$ ) (KASSA et al., 2007) e energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) proteína/inibidores obtida do ancoramento.

COMPOSTOS	$pK_R$	ENERGIA DE INTERAÇÃO
<b>K005</b>	5,30	-143, 48
<b>HI-6</b>	4,92	-142, 98
<b>Metoxima</b>	4,82	-142, 32
<b>K033</b>	4,70	-142, 86
<b>HS-6</b>	4,35	-142, 67
<b>HLö-7</b>	3,00	-141, 91
<b>BI-6</b>	1,00	-140, 21

Como pode ser visto na Tabela 3, o maior valor de  $pK_R$  corresponde a um menor valor de energia de interação intermolecular, assim como o menor valor de  $pK_R$  corresponde a um maior valor de energia de interação intermolecular. Ou seja, os dados teóricos obtidos do ancoramento da enzima *Mm*AChE estão de acordo com os resultados experimentais descritos por KASSA et al. (2007), como pode ser observado no Gráfico 1. Isso evidencia que a técnica de ancoramento molecular é adequada para análise da interação destes compostos com a enzima.

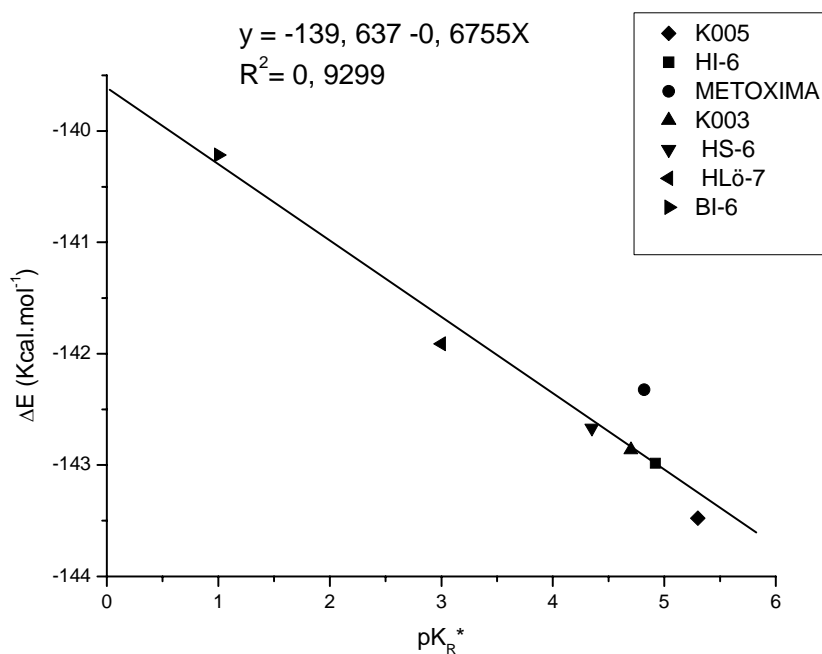


Gráfico 1 Valores de energia intermolecular estimados na análise de *docking* em comparação com os dados experimentais\* (KASSA, et al., 2007)

O composto K005 apresenta um menor valor de energia de interação intermolecular, ou seja, possui uma maior afinidade pelo sítio ativo da *Mm*AChE. Já o composto BI-6 apresenta um maior valor energia de interação intermolecular em comparação aos outros compostos, portanto, apresenta menor afinidade pelo sítio ativo. Com o ancoramento molecular foi possível observar qual a conformação que cada um dos reativadores assumiu, levando em consideração a sobreposição e orientação dos anéis com relação à oxima cristalizada. Na Figura 22, pode-se observar que as melhores conformações para cada reativador apresentaram orientação espacial similar ao resultado experimental.

Selecionadas as melhores conformações, foram analisadas as interações intermoleculares realizadas entre as oximas e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da *Mm*AChE. Neste sentido, cada ligação de hidrogênio formada entre o reativador e a enzima foi analisada, destacando-se quais foram os resíduos de aminoácidos que interagiram mais fortemente com as oximas em estudo. A Tabela 4 mostra os valores de energia e o comprimento de cada ligação de hidrogênio formada com os respectivos resíduos de aminoácido para cada reativador.

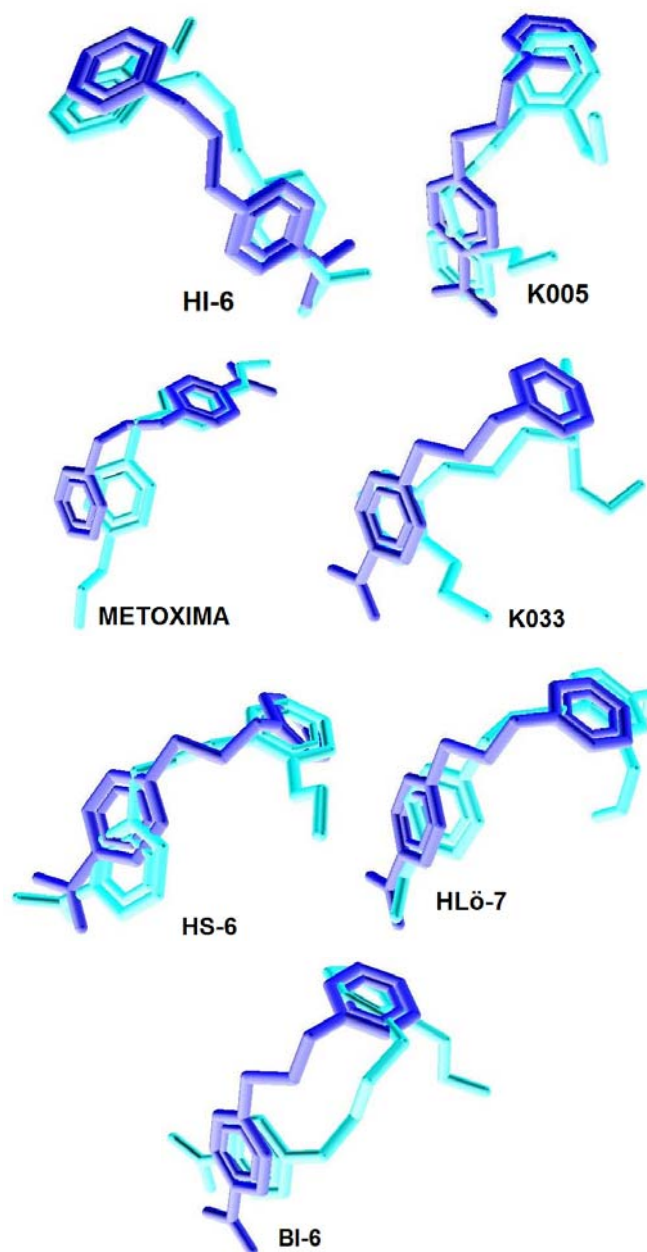


Figura 22 Sobreposição dos reativadores depois do ancoramento. A Oxima cristalizada está representada em azul e os respectivos reativadores indicados nas figuras, estão representados em azul claro

Tabela 4 Valores do comprimento dos ângulos (Å) das ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio (kcal mol<sup>-1</sup>) e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores e a enzima.

<b>Compostos</b>	<b>Comprimento de ligação (Å)</b>	<b>Energia de ligação de hidrogênio (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Resíduos de aminoácidos</b>
<b>K005</b>	3,46	-0,68	Phe338
	3,17	-2,16	Phe295
	3,33	-1,35	Tyr124
	2,72	-2,50	Arg296
	2,75	-0,95	Trp286
<b>HI-6</b>	3,22	-1,90	Tyr124
	2,79	-2,50	Tyr124
	2,87	-2,50	Tyr124
	3,33	-1,320	Tyr124
	2,97	-2,50	Ser298
	3,10	-2,50	Ser298
<b>Metoxima</b>	3,46	-0,69	Thr83
	2,97	-2,50	Tyr337
	3,17	-2,16	Tyr337
	2,61	-2,50	Tyr341
	2,95	-2,50	Tyr124
	3,29	-1,53	Tyr124
	3,13	-2,33	Ser298
	3,30	-1,49	Ser298
<b>K033</b>	3,56	-0,11	Trp286
	2,82	-2,50	Arg296
	3,01	-2,50	Arg296
	3,05	-0,52	Phe295
	3,35	-1,22	Tyr124
	3,50	-0,50	Tyr124
<b>HS-6</b>	2,80	-2,50	Tyr124
	3,09	-2,50	Tyr124
	3,08	-2,50	Phe295
<b>HLö-7</b>	3,34	-1,33	Arg296
	2,72	-2,50	Tyr124
	3,09	-2,50	Tyr124
	2,83	-2,50	Tyr124
	3,11	-2,46	Tyr124
<b>BI-6</b>	3,14	-2,28	Glu285
	3,34	-1,30	Tyr124



Na Tabela 4, pode-se observar que o composto BI-6 é o que faz o menor número de ligações de hidrogênio. O composto HS-6 (Figura 27) apresenta 3 interações, os compostos K005 (Figura 23) e HLö-7 (Figura 28) apresentam 5 interações, já os compostos K033 (Figura 26) e HI-6 (Figura 24) apresentam 6 interações. O composto metoxima (Figura 25) apresenta 8 interações com os aminoácidos do sítio ativo.

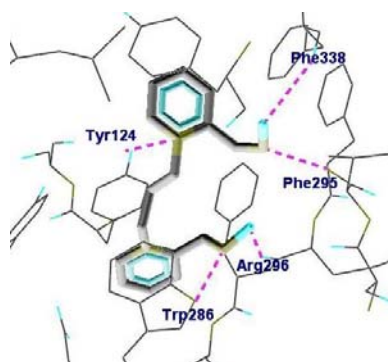


Figura 23 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador K005 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-OP*

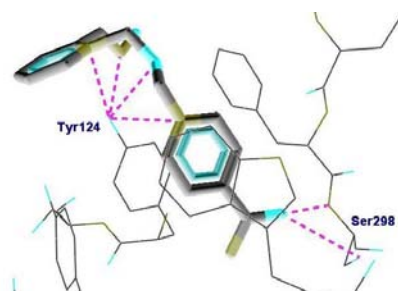


Figura 24 Ligações hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-OP*

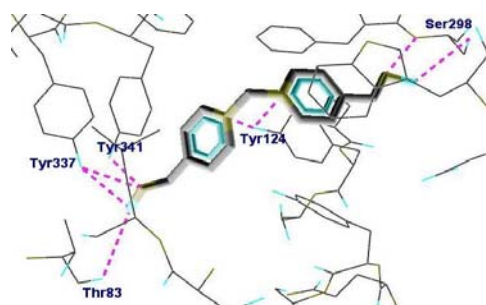


Figura 25 Ligações hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador metoxima ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-OP*

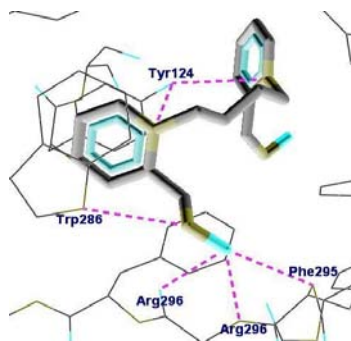


Figura 26 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador K033 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-OP*

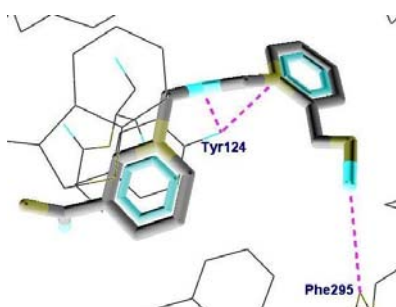


Figura 27 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HS-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-OP*

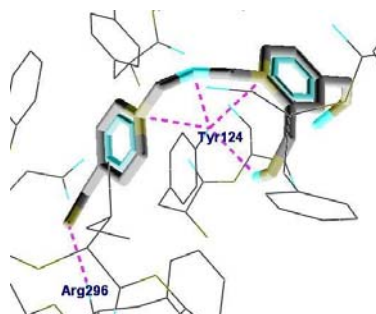


Figura 28 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HLö-7 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-OP*

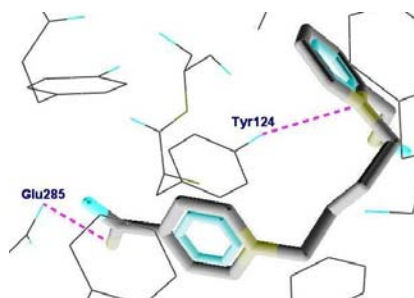


Figura 29 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador BI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-OP*

Todos os reativadores de AChE tem suas estruturas variando a posição e o número de grupos hidroxilamina presentes nos anéis, e a cadeia carbônica que liga os dois anéis através dos seus átomos de nitrogênio. É importante observar que a mínima mudança na estrutura molecular dos reativadores interfere na sua reatividade, e logo, na sua capacidade reativadora da enzima. Foi observada também que a presença dos resíduos de histidina, serina e glutamato (Figura 30)

da tríade catalítica da AChE contribuem para a estabilização dos reativadores no sítio ativo.

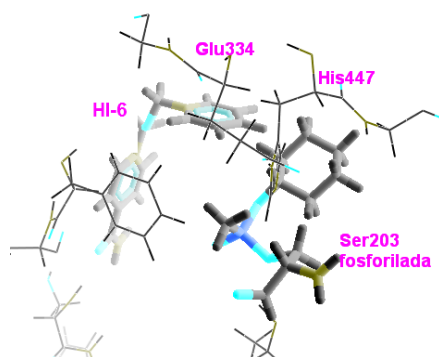


Figura 30 Alguns resíduos de aminoácidos do sítio ativo da *MmAChE*, a oxima HI-6 e o agente neurotóxico ciclosarin. Os aminoácidos His447, Glu334 e Ser203 da tríade catalítica da AChE estão indicados na figura

### 5.1.2 Mecanismo de reação

Para projetar novos e mais seletivos agentes reativadores, é fundamental compreender o mecanismo do processo de reativação por oximas. Além disso, deve levar-se em conta os efeitos estéricos e eletrônicos no mecanismo de reação e na orientação do ligante. O estudo QM/MM é um primeiro passo na compreensão, de forma teórica, da interação entre a *MmAChE* inibida por ciclosarin e os reativadores. A partir dos cálculos, observou-se uma boa concordância entre as geometrias calculadas e experimentais para os ligantes. Após a otimização das conformações selecionadas, o cálculo de frequência foi realizado para assegurar que as oximas apresentadas na Figura 16 possam ser caracterizadas como estruturas de transição. Além disso, para avaliar a influência do tamanho da região QM nos parâmetros cinéticos calculados, foi

realizada uma nova série de cálculos com as diferentes regiões QM, chamadas aqui de modelo-9 e modelo-15. As dificuldades encontradas para simular um ambiente reacional são múltiplas. Em primeiro lugar, o tamanho do sistema real é naturalmente maior do que o sistema isolado. Assim, temos utilizado um procedimento computacional previamente empregado com sucesso em um sistema similar (RAMALHO et al., 2009; RAMALHO; TAFT, 2005).

Segundo os dados apresentados na Tabela 5, a reação de reativação das oximas HLö-7 e HI-6 com a *Mm*AChE inibida por ciclosarin tem a menor e a maior barreiras de energia, respectivamente. Uma menor barreira de energia significa que o composto tem uma menor energia de ativação, ou seja, é mais reativo. Uma correlação muito melhor entre os dados teóricos e experimentais foi obtida com o modelo 15. Esse modelo é mais realista que o modelo-9, pois introduz um maior número de resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da *Mm*AChE. Na verdade, um acréscimo na estabilização do estado de transição é observado por meio de interações de longo alcance, tais como *cation- $\pi$* ,  *$\pi$ - $\pi$  stacking* ou interações eletrostáticas que podem ser realizadas com os resíduos Phe295, Glu285, Ser298, Arg296, Tyr124 e Trp286.

Tabela 5 Energias relativas de ativação e parâmetros cinéticos.

Ligante	$k_r$ <sup>a</sup> (min <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta E^\ddagger$ <sup>b</sup> (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Frequência cm <sup>-1</sup>
HI-6	0.350	220.85	i5.15
BI-6	0.150	170.43	i64.21
Metoxima	0.240	132.00	i16.59
HS-6	0.156	131.12	i13.68
K033	0.095	82.34	i5.21
K005	0.010	31.96	i74.20
HLö-7	0.008	0.00	i2.31

<sup>a</sup> Constante de reativação (KASSA et al., 2007)    <sup>b</sup> $\Delta\Delta E^\ddagger = E_{LIG2} - E_{LIG1}$

Cálculos teóricos foram empregados para obter a estabilidade química relativa dos estados intermediários e de transição no sítio ativo da *MmAChE*. Uma análise mais profunda sugere que a estabilização do estado de transição é favorecida por ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos mais próximos, Trp286, Phe295, Arg296, Phe338 e Tyr124, os quais orientam a oxima em direção à geometria do estado de transição mais adequada. Nessa conformação (Figura 22), a oxima interage mais fortemente com o ciclosarin. Além disso, as interações de longo alcance entre as oximas e os outros aminoácidos também podem ocorrer, como interações *cation- $\pi$*  com Phe338, Phe295, Tyr337 e Tyr34; interações eletrostáticas com Glu285; e, surpreendentemente, interações  *$\pi$ - $\pi$  stacking* entre o anel piridínico da oxima e os resíduos de Tyr124 e Trp286 (ver Figura 23), que ocorrem na geometria do estado de transição. Assim, nossos dados teóricos apontam que os compostos K005 e HLO-7 realmente podem ser promissores reativadores de *MmAChE* inibida por ciclosarin. O composto K005 é considerado um dos melhores reativadores de *MmAChE* inibida por este agente, e apresenta bons resultados de  $K_R$  (Tabela 3), e uma alta afinidade (como HLö-7) para com a enzima, apresentando, conseqüentemente, uma alta reatividade com *MmAChE*. Contudo, o excesso dessas oximas também pode inibir a enzima reativada (KASSA et al., 2007; RAMALHO et al., 2010). Observou-se finalmente que houve uma boa correlação entre os dados experimentais (KASSA et al., 2007) e os dados teóricos, com um valor de coeficiente de correlação  $R^2$  igual a 0,82. No Gráfico 2, é possível ver como os valores teóricos seguem a mesma tendência dos valores experimentais.

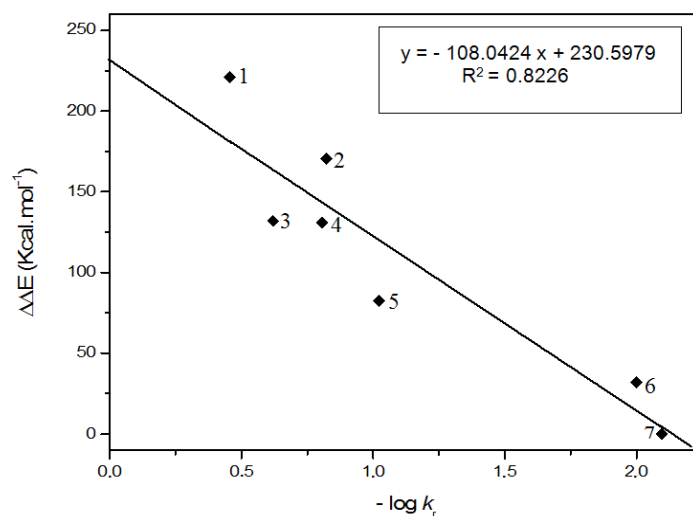


Gráfico 2 Gráfico de  $-\log k_r$  x  $\Delta\Delta E^\ddagger$  para as oximas estudadas. 1 = HI-6, 2 = BI-6, 3 = Metoxima, 4 = HS-6, 5 = K033, 6 = K005, 7 = HLö-7

## 5.2 *HsAChE* inibida por ciclosarin

Os resultados de ancoramento molecular e mecanismos de reação para o sistema de *HsAChE* inibida por ciclosarin estão descritos nos subitens abaixo.

### 5.2.1 Ancoramento molecular

A identidade sequencial entre as enzimas *MmAChE* e *HsAChE* foi avaliada em torno de 88,5%. Na Figura 31, é possível observar que os resíduos do sítio ativo são 100% conservados. Isto sugere que os resultados experimentais, obtidos com a *MmAChE*, podem ser extrapolados para a *HsAChE*.

<i>HuAChE</i>	4	EDAE	LLV	TVRGG	RLRGI	RLK	TPGGPVS	AFLGIPFAEP	PMGPRRF	LPP
<i>MmAChE</i>	1	EGRED	PQLLV	RVRGG	QLRGI	RLK	APGGPVS	AFLGIPFAEP	PVGSRRF	MPP
<i>HuAChE</i>	51	EPK	QFWSGVV	DATTFQ	SVCY	QY	VDTLYPGF	EGTEM	WNP	PNR
<i>MmAChE</i>	51	EPK	RFWSGVL	DATTFQ	NVCY	QY	VDTLYPGF	EGTEM	WNP	PNR
<i>HuAChE</i>	101	VWTPY	PRPTS	PTPVL	VWIYG	GGF	YSGASSL	DVYDGR	FVLVQ	AERTV
<i>MmAChE</i>	101	VWTPY	PRPAS	PTPVL	IWIYG	GGF	YSGAASL	DVYDGR	FVLAQ	VEGAV
<i>HuAChE</i>	151	YRVG	AFGFLA	LPGSRE	APGN	VGLLD	QRLAL	QWVQEN	VAAF	GGDPT
<i>MmAChE</i>	151	YRVG	TFGFLA	LPGSRE	APGN	VGLLD	QRLAL	QWVQEN	IAAF	GGDPM
<i>HuAChE</i>	201	GES	AGAASVG	MHL	SPPSRG	LFHRA	VLQSG	APNG	PWATVG	MGEARRATQ
<i>MmAChE</i>	201	GES	AGAASVG	MHI	LSPRS	LFHRA	VLQSG	TPNG	PWATVS	AGEARRATL
<i>HuAChE</i>	251	LAHL	VGCPPG	G	TGGNDTELV	ACL	RTRPAQV	L	VNHEWHVLP	QESVFRFSFV
<i>MmAChE</i>	251	LARL	VGCPPG	G	AGGNDTELI	ACL	RTRPAQD	L	VNHEWHVLP	QESIIRFSFV
<i>HuAChE</i>	301	PVVD	GDFLSD	T	PEALINAGD	FHGL	QVLVGV	VKDE	GSYFLV	YGAPGFSKDN
<i>MmAChE</i>	301	PVVD	GDFLSD	T	PEALINTGD	FQDL	QVLVGV	VKDE	GSYFLV	YGVPGFSKDN
<i>HuAChE</i>	351	ESLIS	RAEFL	AGVR	VGVVQV	SDL	AAEAVVL	HYTD	WLHPED	PARLREALSD
<i>MmAChE</i>	351	ESLIS	RAQFL	AGVR	IGVPPA	SDL	AAEAVVL	HYTD	WLHPED	PTHLRDAMSA
<i>HuAChE</i>	401	VVG	DHNVCV	VAQ	LAGRLAA	Q	GARVYAYVF	E	HRASTLSWP	LWMGVPHGYE
<i>MmAChE</i>	401	VVG	DHNVCV	VAQ	LAGRLAA	Q	GARVYAYIF	E	HRASTLTWP	LWMGVPHGYE
<i>HuAChE</i>	451	IEFI	FGIPLD	PSR	NYTAEK	I	FAQRLMRYW	A	NFARTGDPN	EPRDPKAPQW
<i>MmAChE</i>	451	IEFI	FGLPLD	PSL	NYTTEER	I	FAQRLMKYW	T	NFARTGDPN	DPRDSKSPQW
<i>HuAChE</i>	501	PPYT	AGAAQY	V	SLDLRPLEV	R	RGLRAQACA	F	WNRFLPKLL	SAT
<i>MmAChE</i>	501	PPYT	TAAQY	V	SLNLKPLEV	R	RGLRAQTCA	F	WNRFLPKLL	SAT

Figura 31 Alinhamento das sequencias primárias das enzimas *MmAChE* e *HsAChE*. Em vermelho, os resíduos diferentes, e em azul os resíduos do sítio ativo

Assim como no estudo da enzima de camundongo, o volume da cavidade para a *HsAChE* também foi avaliado, e encontrado o valor de 31,74 Å<sup>3</sup> (Figura 32).



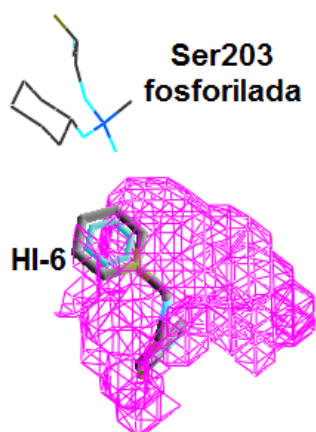


Figura 32 Cavidade (rosa) da enzima *HsAChE*, com a oxima HI-6 e o agente neurotóxico ciclosarin ancorados. Para melhor visualização omitiu-se a proteína

Os resultados teóricos obtidos no ancoramento molecular das oximas na *HsAChE* foram avaliados e comparados com os dados experimentais descritos por KASSA et al. (2007). Os reativadores foram ancorados no sítio ativo da *HsAChE* e sobrepostos na oxima cristalizada dentro da enzima. As energias de interação intermolecular, ligante-proteína calculadas estão descritas na Tabela 6. Esses valores de energia fornecem informações quanto à afinidade dos compostos com o sítio ativo da enzima e, assim, sugerem quais desses compostos poderiam formar complexos enzima-inibidor-reativador mais estáveis.

Tabela 6 Valores da constante experimental de dissociação do complexo reativador-enzima inibida ( $pK_R = -\log K_R$ ,  $\mu\text{M}$ ) (KASSA et al., 2007), energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) proteína/inibidores obtida do ancoramento.

<b>COMPOSTOS</b>	$pK_R$	<b>ENERGIA DE INTERAÇÃO</b>
<b>K005</b>	5,30	-140, 67
<b>HI-6</b>	4,92	-140, 77
<b>Metoxima</b>	4,82	-136, 18
<b>K033</b>	4,70	-137, 32
<b>HS-6</b>	4,35	-133, 62
<b>HLö-7</b>	3,00	-129, 29
<b>BI-6</b>	1,00	-121, 29

Como pode ser observado na Tabela 3, os maiores valores de  $pK_R$  correspondem aos menores valores de energia de interação intermolecular, assim como o menores valores de  $pK_R$  correspondem aos maiores valores de energia de interação intermolecular. Ou seja, os dados teóricos obtidos do ancoramento molecular na *HsAChE* também estão de acordo com os resultados experimentais descritos por KASSA et al. (2007), como pode ser observado no Gráfico 3.

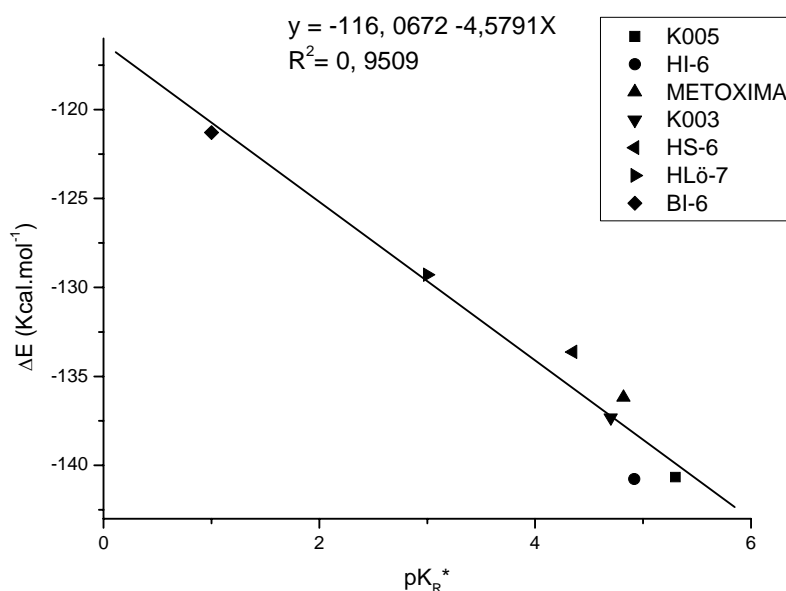


Gráfico 3 Valores de energia intermolecular estimadas na análise de *docking* em comparação aos dados experimentais\* (KASSA, et al., 2007)

Os dados do ancoramento molecular seguem a mesma tendência dos dados experimentais (KASSA, et al., 2007), assim como os resultados de ancoramento molecular na *Mm*AChE. Os compostos HI-6 e K005 apresentam os menores valores de energia de interação intermolecular, dessa forma possuem uma maior interação com o sítio ativo da *Hs*AChE, sugerindo que eles sejam mais estáveis e, conseqüentemente, tenham um maior potencial de reativação. Porém o composto BI-6 apresenta um maior valor energia de interação intermolecular quando comparado aos outros compostos, portanto, possui menor afinidade pelo sítio ativo e assim tem um menor potencial de reativação. Esses resultados estão de acordo com os resultados do estudo de *docking* do sistema 1 (*Mm*AChE), mostrando que os valores experimentais da enzima de camundongo, como esperado, podem ser extrapolados para a enzima humana.

No estudo de *docking* foi possível observar a conformação assumida pelos reativadores no interior do sítio ativo. A Figura 33 mostra as oximas sobrepostas à estrutura cristalina do HI-6.

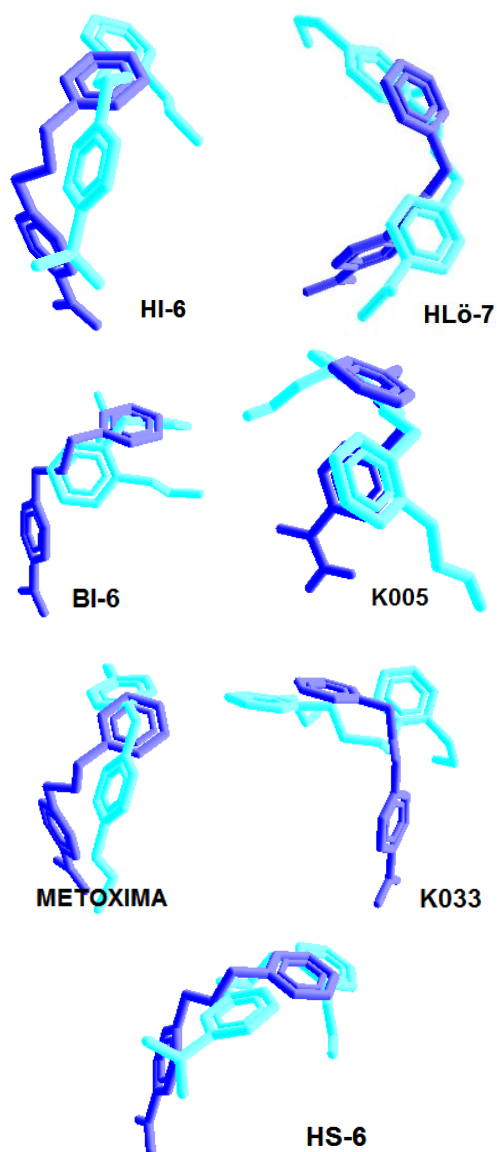


Figura 33 Sobreposição dos reativadores depois do ancoramento na *HsAChE*. A Oxima cristalizada está representada em azul e os respectivos reativadores indicados nas figuras, estão representados em azul claro

Como observado na Figura 35, as conformações das oximas após o ancoramento molecular na *HsAChE*, não ficaram sobrepostas ao cristal de HI-6 tão bem quanto no estudo do sistema 1 (*MmAChE*). Este resultado já era esperado uma vez que, as melhores conformações não foram escolhidas seguindo-se o cristal HI-6 como referência, e sim, levando-se em consideração a proximidade entre a hidroxila reativa da oxima ancorada e o grupo fosfato do ciclosarin no interior do sítio ativo. Este critério foi utilizado devido à diferença conformacional apresentada pelo resíduo de aminoácido Trp286 nas enzimas *MmAChE* e *HsAChE*. Na *HsAChE*, este resíduo está posicionado de forma que se sobrepõe a uma parte da oxima cristalizada na *MmAChE*, diminuindo, assim, o tamanho da cavidade da *HsAChE*. Após a seleção das melhores conformações, foram analisadas as interações intermoleculares realizadas entre as oximas e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da *HsAChE* levando-se em consideração cada interação de hidrogênio formada entre a oxima e a enzima, destacando-se quais foram os resíduos de aminoácidos que interagiram mais fortemente com os compostos em estudo. A Tabela 7 apresenta os valores de energia e o comprimento de cada ligação hidrogênio formada com os respectivos resíduos de aminoácido para cada reativador.

Tabela 7 Valores do comprimento (Å) e energia (kcal mol<sup>-1</sup>) das ligações hidrogênio e resíduos de aminoácidos com os quais as interações são formadas entre os inibidores e a enzima.

Compostos	Comprimento de ligação (Å)	Energia de ligação de hidrogênio (kcal mol <sup>-1</sup> )	Resíduos de aminoácidos
<b>K005</b>	2,99	-0,31	Asp74
	2,60	-2,50	Tyr72
	3,26	-1,69	Ser125
	2,66	-2,50	Ser125
	3,26	-1,69	Ans87
	3,03	-2,50	Tyr124
	3,16	-2,18	Tyr124
	3,11	-2,46	Tyr124
	3,0	-2,50	Tyr124
	3,32	-1,39	Ciclosarin
	3,46	-0,60	Ciclosarin
<b>HI-6</b>	3,14	-2,28	Tyr337
	2,99	-2,50	Tyr337
	2,56	-2,22	Tyr124
	3,32	-1,39	Tyr124
	2,50	-1,69	Tyr124
	3,26	-1,13	Tyr124
	2,73	-2,50	Arg296
	2,80	-2,50	Ciclosarin
	2,85	-2,12	Ciclosarin
<b>Metoxima</b>	3,09	-2,50	Tyr72
	2,26	0,28	Ser125
	2,40	-0,83	Ser125
	3,34	-1,31	Tyr341
	3,10	-2,47	Tyr124
	2,98	-0,58	Phe295
	3,18	-2,06	Arg296
	2,75	-0,058	Arg296
	2,98	-2,50	Ser293
	2,79	-2,50	Arg296
<b>K033</b>	2,93	-2,50	Tyr124
	2,85	-2,50	Ciclosarin
	3,09	-2,50	Arg296
	2,99	-2,50	Arg296
	2,96	-0,38	Phe295

Tabela 7, Continuação

Compostos	Comprimento de ligação (Å)	Energia de ligação de hidrogênio (kcal mol <sup>-1</sup> )	Resíduos de aminoácidos
<b>HS-6</b>	3,04	-2,50	Ciclosarin
	2,73	-2,50	Tyr124
	1,97	2,83	Tyr124
	3,13	-2,33	Tyr124
	2,61	-2,50	Tyr124
	3,09	-2,50	Arg296
	3,01	-2,50	Ser293
	3,44	-0,79	Tyr341
<b>HLö-7</b>	2,81	-1,80	Tyr72
	3,13	-2,30	Tyr124
	2,95	-2,50	Ciclosarin
	2,92	-2,50	Ciclosarin
<b>BI-6</b>	2,21	0,73	Tyr72
	3,13	-2,34	Gln71
	2,04	2,22	Ser125
	2,83	-1,64	Asp74
	2,59	-2,49	Ans87
	3,16	-2,17	Tyr124
	2,97	-2,50	Tyr124
	3,08	-2,50	Tyr124
	2,31	-0,13	Ciclosarin

O composto K005 realizou 11 interações (Figura 34), o composto metoxima realizou 10 (Figura 35), os compostos HI-6 e BI-6 realizaram 9 (Figuras 36 e 37), o HS-6 realizou 8 (Figura 38), o K033 realizou 5 (Figura 39) e o HLö-7 (Figura 40) fez 4 interações com os aminoácidos do sítio ativo. O número de interações que cada oxima realizou com os resíduos do sítio ativo não obedeceu a mesma tendência observada no estudo de *docking* para a *Mm*AChE.

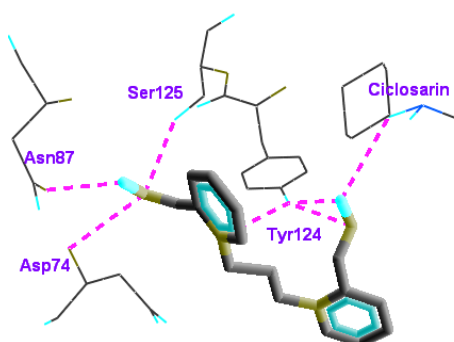


Figura 34 Ligações hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador K005 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-OP*

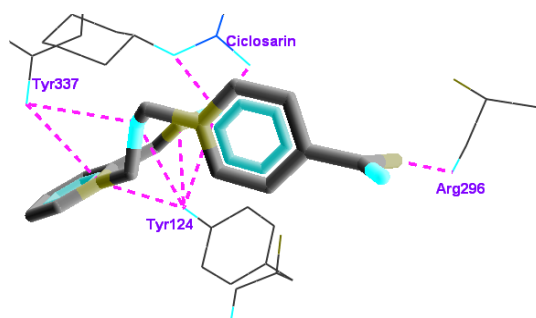


Figura 35 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-OP*

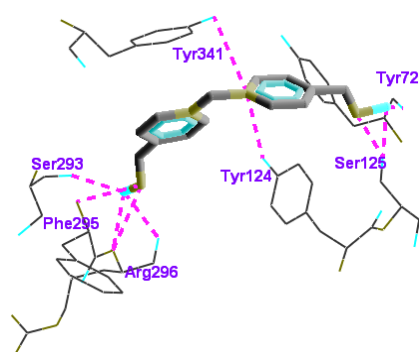


Figura 36 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador metoxima e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-OP*



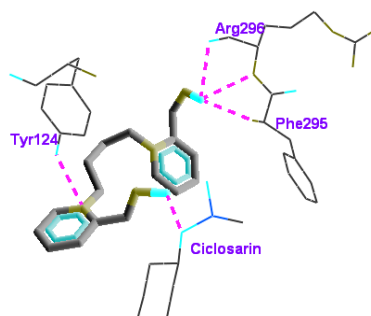


Figura 37 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador K033 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-OP*

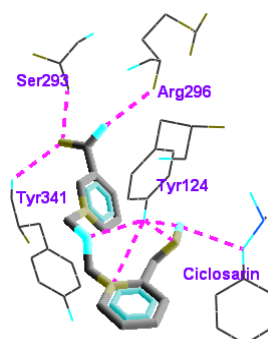


Figura 38 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HS-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-OP*

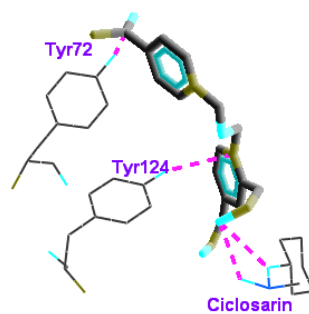


Figura 39 Ligações hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador HLö-7 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-OP*

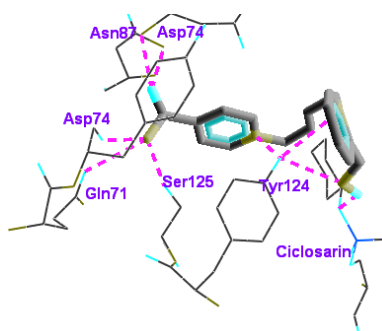


Figura 40 Ligações de hidrogênio (tracejado rosa) formadas entre o reativador BI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-OP*

Todas as oximas, com exceção da metoxima, também realizaram interações com o ciclosarin. Estas interações sugerem que as oximas se posicionaram bem próximas a ele favorecendo ainda mais o processo de reativação. Sugere-se assim que as oximas interagem com o sítio ativo da *HsAChE*, formando um complexo enzima-inibidor-reativador estável, e que provavelmente favorecerá o processo de reativação da AChE.

### 5.2.2 Mecanismo de reação

O mesmo procedimento descrito para o sistema 1 (*MmAChE*) foi empregado para avaliar o mecanismo de reação da *HsAChE*. De acordo com os dados apresentados na Tabela 8, a reação de reativação feita pelas oximas HLö-7 e HI-6 na *HsAChE* inibida por ciclosarin tem a maior e menor barreira de energia, respectivamente, concordando com os resultados observados para a *MmAChE*. Uma menor barreira de energia significa que o composto tem uma menor energia de ativação, ou seja, é mais reativo. Portanto, a HLö-7, que apresentou um valor relativo de energia de ativação muito menor que todos os

outros compostos, é um forte candidato a fármaco em casos de intoxicação de humanos por ciclosarin. Estes estudos confirmaram a alta reatividade desse composto, já prevista por Kassa et al. (2007) em estudos experimentais com a MmAChE inibida por ciclosarin.

Tabela 8 Energias relativas de ativação e parâmetros cinéticos

<b>Ligante</b>	$k_r^a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\Delta\Delta E^\ddagger^b$ ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ )	<b>Frequencia</b> ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>HI-6</b>	0.350	78,68	i260,20
<b>BI-6</b>	0.150	78,15	i174,76
<b>Metoxima</b>	0.240	79,48	i176,72
<b>HS-6</b>	0.156	78,41	i199,02
<b>K033</b>	0.095	78,60	i200,38
<b>K005</b>	0.010	78,29	i239,81
<b>HLö-7</b>	0.008	0.00	i194,53

<sup>a</sup>Constante de reativação (KASSA et al., 2007) <sup>b</sup> $\Delta\Delta E^\ddagger = E_{\text{LIG2}} - E_{\text{LIGi}}$

Analisando-se os resultados, sugere-se que a estabilização do estado de transição é favorecida por ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Arg296 e Tyr124 e também com o ciclosarin, os quais orientam a oxima em direção à geometria de estado de transição mais adequada. Além disso, como já foi mencionado, as interações de longo alcance entre as oximas e os outros aminoácidos também podem ocorrer, como interações *cation- $\pi$*  com Phe338, Phe295, Tyr337 e Tyr34; interações eletrostáticas com Glu285.

Interações  $\pi$ - $\pi$  *staking* entre o anel piridínico da oxima e o resíduo de Tyr124 que ocorrem na geometria do estado de transição também foram observadas.

Os dados teóricos apontam os compostos HI-6, K005 e HLö-7 como promissores reativadores de *HsAChE* inibida por ciclosarin. Os compostos HI-6 e K005 são considerados os compostos com maior afinidade pelo sítio ativo da *HsAChE* inibida por este agente, e o HLö-7 mostrou alta reatividade com esta enzima (Tabela 8). No Gráfico 4, pode-se observar a correlação entre os dados experimentais (KASSA et al., 2007) e os dados teóricos.

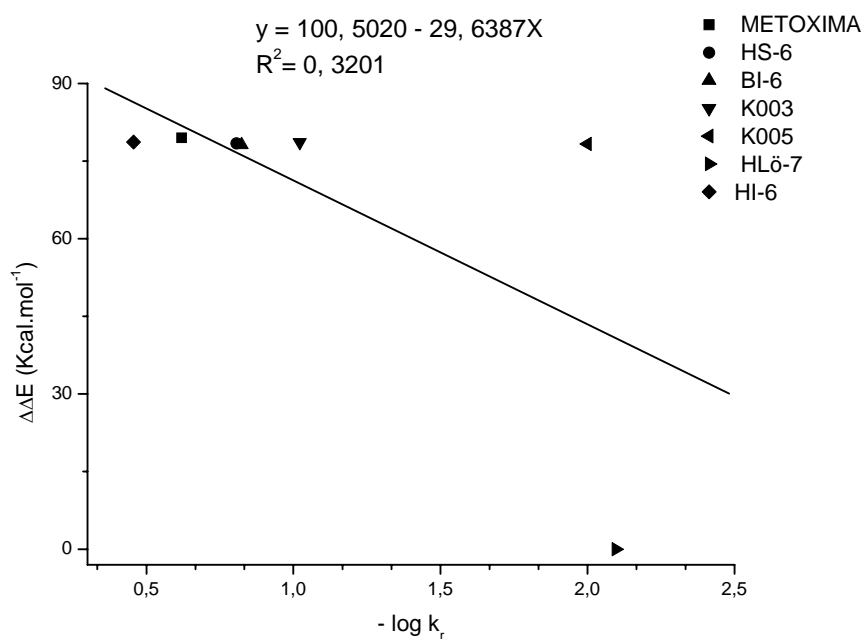


Gráfico 4 Gráfico de  $-\log k_r$  x  $\Delta\Delta E^\ddagger$  para as oximas estudadas

O valor do coeficiente de correlação  $R^2$  igual a 0,32 é baixo e não é considerado satisfatório. Esse valor informa que não houve uma boa correlação entre os dados teóricos de energia relativa de ativação e os dados experimentais de constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor-reativador. Esse baixo valor de correlação é devido principalmente à predição teórica para o composto K005. Embora os valores experimentais de constante de reativação ( $k_R$ ) para os compostos K005 e HLö-7 sejam muito próximos, a diferença no valor calculado de energia de ativação relativa entre estes dois compostos é alta. Isso pode ser explicado pelas duas ligações de hidrogênio que o HLö-7 realiza com o inibidor ciclosarin, o que não acontece com o K005, o qual apresenta valores de energia e de comprimentos de ligação para as interações com o ciclosarin bem menor. A energia de ligação é a principal fonte de energia livre usada pelas enzimas para diminuir as energias de ativação das reações, desta forma, as fortes interações realizadas com o ciclosarin poderiam explicar a maior reatividade do HLö-7.

A fim de, compreender melhor a má correlação obtida entre os dados de energia relativa de ativação ( $\Delta\Delta E^\ddagger$ ) e a constante de reativação ( $k_r$ ), para o estudo de mecanismo de reação do sistema 2 (*HsAChE*), analisou-se os sítios de ligação das enzimas e as interações com os resíduos mais relevantes para estabilização dos compostos no sítio ativo. É importante salientar que a identidade sequencial entre a enzima de camundongo e a humana é de 88,5%, e os respectivos sítios ativos se conservam em 100%.

Foi observado que a cadeia lateral do resíduo Trp286 do sítio ativo em ambas as enzimas (Figura 41), assume conformações diferentes. A diferença na conformação do Trp286 observada está representada na Figura 42.

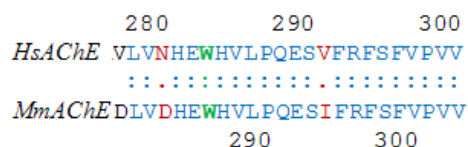


Figura 41 Recorte do alinhamento sequencial entre as enzimas de camundongo e humana, destacando-se o resíduo Trp286 (W) em verde

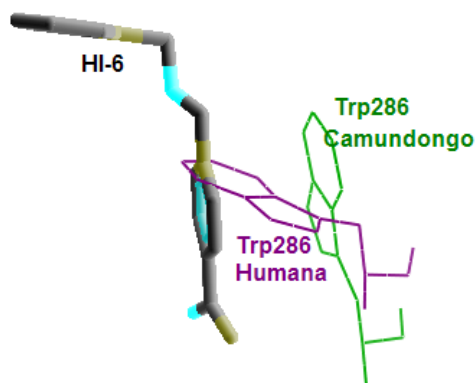


Figura 42 Sobreposição das enzimas *MmAChE* e *HsAChE*. Omitiu-se o restante dos resíduos de aminoácidos para melhor visualização. O composto HI-6 é a oxima cristalizada na *MmAChE*.

Como pode ser observado na Figura 42, o resíduo de Trp286 na enzima cristalizada de camundongo tem uma conformação que favorece a estabilidade do reativador no sítio ativo por meio de interações  $\pi$ - $\pi$  *stacking*. Estas interações entre o anel pirimidínico da oxima e os resíduos Tyr124 e Trp286 são importantes para a estabilização do estado de transição, conferindo ao composto maior potencial de reativação. No cristal da enzima humana, porém, observou-se o contrário. O Trp286 tem uma conformação que impede a entrada do reativador no sítio ativo da enzima. Isso explica o menor volume de cavidade encontrado

para a enzima humana, em relação ao volume da cavidade da enzima de camundongo.

Outro fator importante, que pode estar relacionado à diferença espacial do resíduo de Trp286 nas duas enzimas, é a conformação assumida pelas oximas após o estudo de *docking*. Uma vez que na enzima *HsAChE* as melhores conformações não foram sobrepostas no cristal da oxima HI-6, como observado na *MmAChE*.

Avaliando-se todos os dados deste estudo, a enzima *MmAChE* não seria o modelo mais adequado para estudos experimentais a fim de extrapolar os dados para humanos, embora tenha alto grau de identidade sequencial com a enzima humana, como já foi mencionado. Porém, a conformação do resíduo Trp286 nas enzimas (Figura 42) pode ser devido à forma em que as enzimas foram cristalizadas. A *MmAChE* foi cristalizada complexada com o HI-6, e a *HsAChE* cristalizada sem reativador. Não foi encontrada no PDB (*Protein Data Bank*) nenhuma estrutura de *HsAChE* cristalizada com alguma oxima, para comparação e confirmação de que o resíduo de Trp286, nesta enzima, realmente permanece na conformação demonstrada na Figura 42. Foi realizada então, a comparação entre as estruturas da *MmAChE* complexada com a oxima HI-6, e as enzimas *MmAChE* e *HsAChE* sem reativador (Figura 43). As conformações da cadeia lateral do resíduo de Trp286 nas enzimas sem reativador são similares entre si, e diferentes na enzima cristalizada com o reativador.

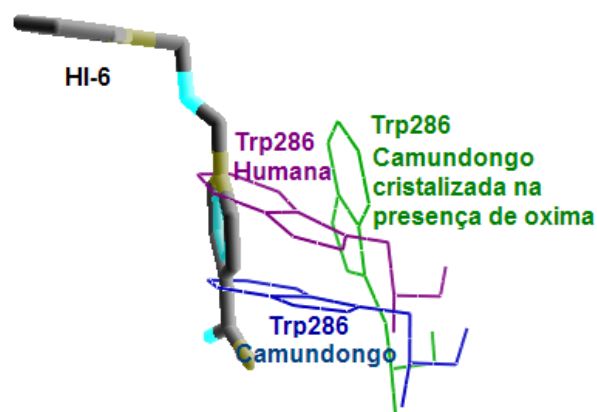


Figura 43 Sobreposição das enzimas *Mm*AChE cristalizada na presença da oxima HI-6, *Mm*AChE e *Hs*AChE. Omitiu-se o restante dos resíduos de aminoácidos para melhor visualização

Avaliando-se a Figura 43, pode-se concluir que possivelmente o Trp286 assume a conformação representada em verde na figura, depois da complexação com uma oxima. Mas para confirmação desta hipótese estudos de dinâmica molecular serão realizados com a enzima humana, a fim de verificar se o Trp286 tem energia suficiente para romper a barreira de interconversão e assumir outra conformação. Acredita-se que em solução o Trp286 da enzima humana assumirá a conformação igual a de camundongo.

Em uma análise mais profunda, fica claro que existe a possibilidade dos dados experimentais de *Mm*AChE serem extrapolados para estudos com a *Hs*AChE, principalmente se forem levados em consideração os detalhes descritos acima, visando minimizar sempre os possíveis erros.

O Trp286 parece ser um resíduo chave para estabilização destes compostos no sítio ativo da AChE, atuando de forma relevante no mecanismo de reativação da AChE por oximas. Além disso, é o único resíduo do sítio ativo que



muda de conformação nos cristais das enzimas, portanto, seu papel neste mecanismo de reação deve ser melhor investigado.

Os estudos com as duas enzimas, de camundongo e humana, sugerem a oxima HLö-7 (Figura 16) como o composto com melhor potencial de reativação, embora o K005 (Figura 16) também tenha apresentado bons resultados de ancoramento molecular para ambas enzimas. Portanto, sugere-se uma nova oxima, que é uma combinação das estruturas destes dois compostos. Espera-se que o novo reativador proposto (Figura 44) tenha atividade melhorada contra envenenamento por ciclosarin.

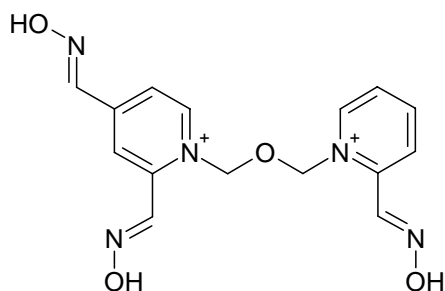


Figura 44 Nova oxima proposta a partir das estruturas do HLö-7 e K005

A nova oxima tem um anel pirimidínico com duas funções oximas, assim como o composto HLö-7. Da estrutura do HLö-7 foi conservada também a cadeia carbônica e a função éter. O segundo anel da nova oxima corresponde ao segundo anel da estrutura da K005, o qual também tem como substituinte uma função oxima. Espera-se que o átomo de oxigênio na cadeia entre os anéis pirimidínicos favoreça as interações de hidrogênio com o resíduo de Tyr124, e conseqüentemente à maior estabilização do composto no interior do sítio ativo da enzima. Além disso, acredita-se que o aumento do número de funções oxima

como substituintes nos anéis pode contribuir para o aumento da reatividade da oxima proposta.

### **5.3 *Mm*AChE inibida por carbofurano**

Os resultados de ancoramento molecular e mecanismos de reação para o sistema de *Mm*AChE inibida por carbofurano estão descritos nos subitens abaixo.

#### **5.3.1 Ancoramento molecular**

A identidade sequencial entre as enzimas *Mm*AChE e *Tc*AChE é de 58,6%. Na Figura 45 é possível observar que os resíduos do sítio ativo são 95% conservados. Esse valor permite que as coordenadas cristalinas do CB contido na *Tc*AChE sejam copiadas para dentro da *Mm*AChE, uma vez que as enzimas foram sobrepostas e colocadas nas mesmas coordenadas. Desta forma, as coordenadas cristalinas deste CB foram usadas como referência para o ancoramento do carbofurano dentro da enzima *Mm*AChE. Na Figura 46 é possível ver o resíduo de Ser203 após a inibição.

```

      10          20          30          40          50          60
TcAChE DHSELLVNTKSGKVMGTRVPVLSHISAF LGIPFAEPPVGNMRFRRPEPKKPWSGVWNAS
MmAChE EDPQLLVRRVGGQLRGI RLKAPGGPVSAFLGIPFAEPPVGSRRFMPPEPKRPWSGVLDAT
      10          20          30          40          50          60

      70          80          90          100         110         120
TcAChE TYPNNCQYVDEQFPFGFSGSEMWNPNREMSEDCLYLNIWVPSRPKSTI-VMVNIYGGGF
MmAChE TFQNVCYQYVDITLYPGFEGTEMWNPNRELS EDCLYLNVWITPYPRPASPTPVLWIYGGGF
      70          80          90          100         110         120

      130         140         150         160         170         180
TcAChE YSGSSTLDVYNGKYLAYTEEVVLSLSYRVGAFGF LALHGSQEAPGNVGLLDQRMALQWV
MmAChE YSGAASLDVYDGRFLAQVEGAVLVSMNYRVGTFGFLALPGSREAPGNVGLLDQRLALQWV
      130         140         150         160         170         180

      190         200         210         220         230         240
TcAChE HDNIQFFGGDPKVTIIFGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCPWASVSVAE
MmAChE QENIAAFGGDPMSVTLFGESAGGASVGMHILSLPSRSLFHRAVLQSGTPNGPWATVSAGE
      190         200         210         220         230         240

      250         260         270         280         290
TcAChE GRRRAVELGRNLC----NLNSDEELIHCLREKKPQELIDVEWNVLPFDSIFRFSFVPI
MmAChE ARRRATLLARLVGCPGGAGNDTELIACLRT RPAQDLVDHEWHVLPQESIFRFSFVPI
      250         260         270         280         290         300

      300         310         320         330         340         350
TcAChE DGEFFPTSLESMLNSGNFKKTIQLLGVNKDEGSFFLLYGAPGFSKDSESKISREDFMSGV
MmAChE DGDFLSDIPEALINTIGDFQDLQVLVGVVKDEGSYFLVYGVPGFSKDNE SLISRAQFLAGV
      310         320         330         340         350         360

      360         370         380         390         400         410
TcAChE KLSVPHANDLGLDAVILQYTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFGN
MmAChE RIGVPAQSDLAEEAVVLHYTDWLHPEDPTHLRDAMS AVVGDHNVCVPAQLAGRLAAQGA
      370         380         390         400         410         420

      420         430         440         450         460         470
TcAChE GTIYLYFFNHRASNLVWPEWVGVIHGYEIEFV FGLPLVKELNYTAE EEA LSRRIMHYWATF
MmAChE RVYAYIFEHRASITLWPLWGVPHGYEIEFIFGLPLDPSLNYTTEERI FAQRLMKYWNF
      430         440         450         460         470         480

      480         490         500         510         520         530
TcAChE AKTGNPNEPHSQES-KWPLFITKEQKFIDLNTEPMKVHQRLRVQMCVFWNQFLPKLLNAT
MmAChE ARTGPNDRDSKSPQWPPYITAAQQYVSLNLKPLEVRRGLRAQTCAFWNRFLPKLLSAT
      490         500         510         520         530         540

TcAChE ACD
MmAChE ATE

```

Figura 45 Alinhamento das seqüências primárias das enzimas *MmAChE* e *TcAChE*. Em vermelho, os resíduos do sítio ativo

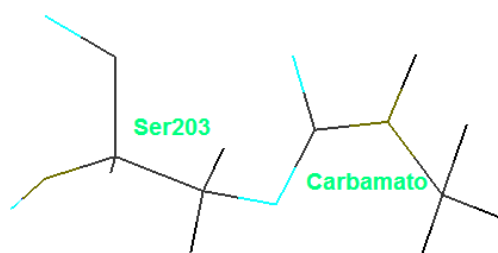


Figura 46 Carbofurano após o ancoramento molecular ligado ao resíduo de Ser203. Para melhor visualização omitiu-se o restante da enzima

O volume da cavidade foi de 153,60 Å<sup>3</sup> e está representado na Figura 47, juntamente com uma oxima e o agente neurotóxico carbofurano.

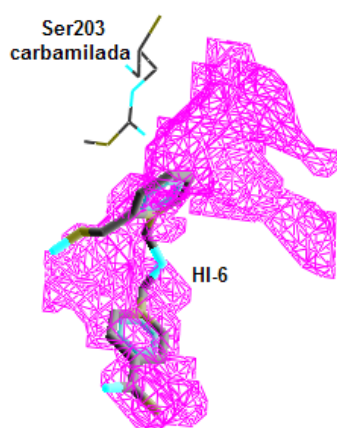


Figura 17 Cavidade (rosa) da enzima *MmAChE*, com a oxima HI-6 e o agente neurotóxico carbofurano ancorados. Para melhor visualização omitiu-se a proteína

Os reativadores foram ancorados no sítio ativo da *MmAChE* inibida pelo carbofurano e sobrepostos na oxima cristalizada dentro da enzima. As energias intermoleculares ligante-proteína foram calculadas para melhor entender quais são as variações entre os modos de interação dos compostos no sítio ativo da enzima e verificar quais os fatores são responsáveis pela atividade dos reativadores. Os valores de energia de interação intermolecular entre as oximas e a proteína podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9 Valores de energia de interação intermolecular (kcal mol<sup>-1</sup>) proteína/inibidores obtidos do ancoramento

<b>COMPOSTOS</b>	<b>ENERGIA DE INTERAÇÃO</b>
<b>BI-6</b>	-150,98
<b>HLö-7</b>	-146,44
<b>HS-6</b>	-137,34
<b>K005</b>	-136,44
<b>HI-6</b>	-131,66
<b>Metoxima</b>	-128,03
<b>K033</b>	-127,48

De acordo com a Tabela 9 o composto BI-6 apresenta um menor valor de energia de interação intermolecular, ou seja, possui uma maior interação com o sítio ativo da *Mm*AChE inibida por CB. Já o composto K033 apresenta um valor energia de interação intermolecular maior.

Com o ancoramento molecular foi possível observar qual a conformação que cada uma das oximas assumiu, levando em consideração a conformação da oxima cristalizada. Na Figura 48, pode-se observar as melhores conformações das estruturas dos reativadores sobrepostas ao cristal.

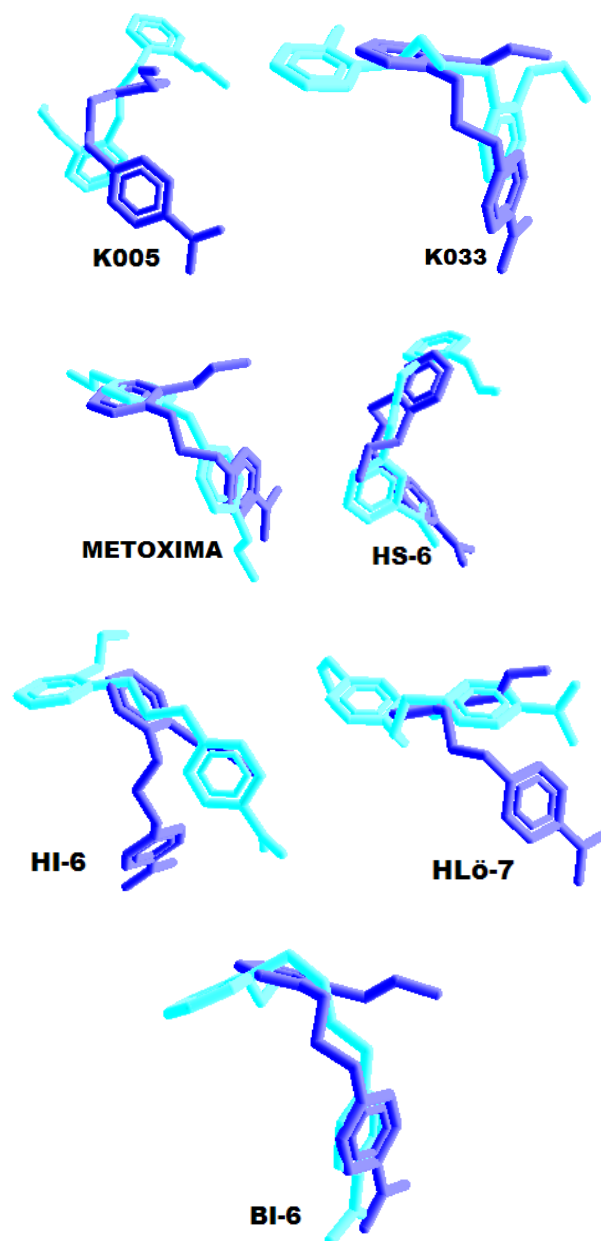


Figura 48 Sobreposição dos reativadores depois do ancoramento. A Oxima cristalizada está representada em azul e os respectivos reativadores indicados nas figuras, estão representados em azul claro

Selecionadas as melhores conformações, foram analisadas as interações intermoleculares realizadas entre as oximas e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da *MmAChE*-CB. Neste sentido, foram observadas cada ligação de hidrogênio formada entre o reativador e a enzima, destacando-se quais foram os resíduos de aminoácidos que interagiram mais fortemente com as oximas em estudo. A Tabela 10 mostra os valores de energia e o comprimento de cada ligação hidrogênio formada com os respectivos resíduos de aminoácido para cada reativador.

Tabela 10 Valores do comprimento (Å) das ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio (kcal mol<sup>-1</sup>) e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores e a enzima

Compostos	Comprimento de ligação (Å)	Energia de ligação de hidrogênio (kcal mol <sup>-1</sup> )	Resíduos de aminoácidos
<b>K005</b>	2,70	-1,06	Gly122
	3,25	-1,07	Gly121
	2,96	-2,50	Ser203
	2,82	-2,50	Tyr337
	3,18	-2,08	Tyr337
	2,98	-2,50	Thr83
<b>HI-6</b>	3,17	-2, 11	Ser203
	3,06	-0,94	Gly122
	3,56	-0,03	Gly121
	3,24	-1,77	Tyr124
	3,28	-1,58	Tyr124
	3,18	-1,83	Trp286
	2,90	-2,50	Ser293
2,88	-2,50	Tyr341	
<b>Metoxima</b>	2,71	-2,50	Ser203
	3,07	-1,23	Gly121
	3,54	-0,09	Gly121
	2,96	-3, 34	Gly122
	3,06	-2, 50	Tyr124
	3, 01	-2,50	Tyr124
3, 10	-2,50	Glu285	

Tabela 10, Continuação

<b>Compostos</b>	<b>Comprimento de ligação (Å)</b>	<b>Energia de ligação de hidrogênio (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Resíduos de aminoácidos</b>
<b>K033</b>	2,62	-2,50	Ser203
	2,97	-0,38	Gly121
	3,12	-0,44	Gly122
	3,32	-1,37	Tyr124
	2,44	-0,40	Phe295
	3,16	-2,19	Arg296
	2,92	-2,50	Arg296
<b>HS-6</b>	3,00	-2,50	Tyr124
	3,10	-2,49	Tyr124
	3,07	-2,50	Tyr124
	2,66	-2,50	Arg296
<b>HLö-7</b>	2,99	-2,50	Glu202
	3,02	-2,50	Ser203
	3,15	-1,23	Gly121
	3,10	-0,14	Gly122
	2,83	-2,50	Tyr124
	3,16	-2,16	Tyr124
	3,16	-1,06	Phe295
	2,65	-2,50	Arg296
<b>BI-6</b>	3,06	-2,50	Tyr124
	3,14	-2,25	Tyr124
	3,30	-1,48	Tyr124
	3,12	-2,36	Glu285

Na Tabela 10, pode-se observar que os compostos BI-6 e HS-6 são os que fazem os menores números de ligações hidrogênio. O composto K005 apresenta 6 interações, os compostos K033 e metoxima apresentam 7 interações e os compostos HI-6 e HLö-7 apresentam 8 interações com os aminoácidos do sítio ativo.

As ligações mais estáveis do composto K005 são com os resíduos de aminoácidos Ser203, Tyr337 e Thr83. Elas podem ser observadas na Figura 49.



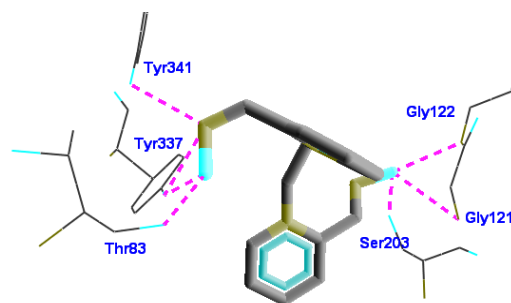


Figura 49 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador K005 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE*-CB

Na Figura 50 é possível notar as ligações hidrogênio formadas entre a HI-6 e os resíduos de aminoácidos. As interações mais estáveis são realizadas com os resíduos Tyr341 e Ser293.

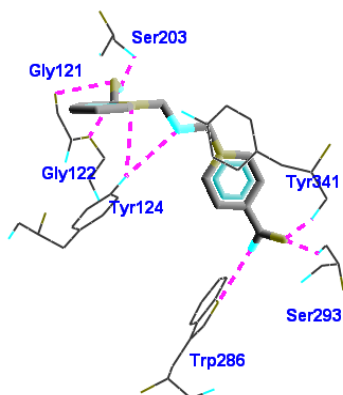


Figura 50 Ligações hidrogênio formadas entre o reativador HI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE*-CB

Já para o composto metoxima, as ligações de hidrogênio com energia mais estável são encontradas nos resíduos Tyr124, Ser203 e Glu285. Estas e as outras ligações hidrogênio formadas com este composto podem ser observadas na Figura 51.

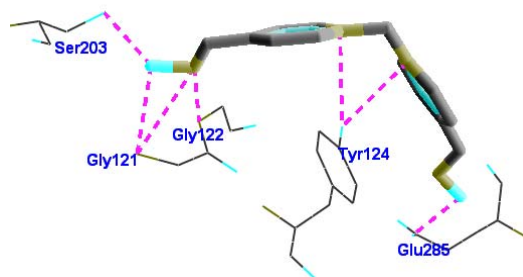


Figura 51 Ligações hidrogênio formadas entre o reagente metoxima ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-CB*

O reagente K033 apresenta interações de menor energia com os resíduos de Arg296 e Ser203, e o reagente HS-6 com os resíduos de Tyr124 e Ser203 (Figuras 52 e 53).

O reagente HLö-7 interage de forma mais efetiva com os resíduos de Arg296, Ser203 e Glu202 (Figura 54), já o composto BI-6 interage mais fortemente com o resíduo Tyr124 e suas interações podem ser observadas na Figura 55.

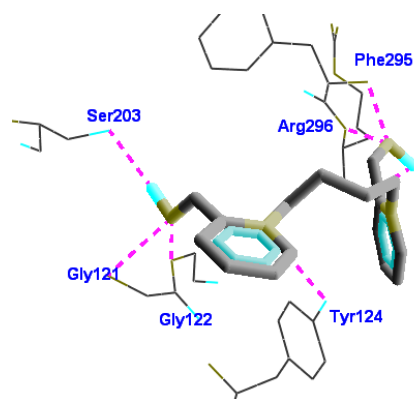


Figura 52 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador K033 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-CB*

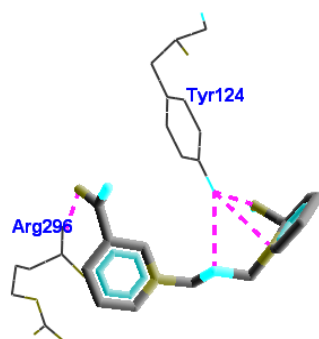


Figura 53 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HS-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-CB*

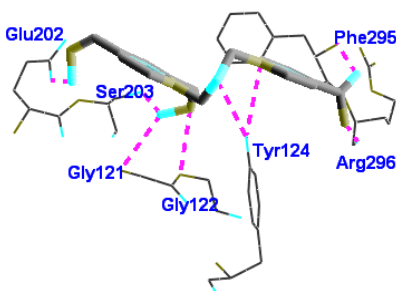


Figura 54 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HLö-7 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-CB*

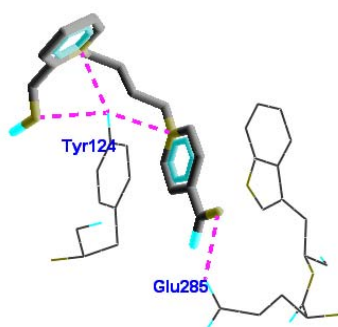


Figura 55 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador BI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *MmAChE-CB*

Os resultados dos estudos de ancoramento molecular apontam as oximas BI-6 e HLö-7 como os compostos que interagiram com o sítio ativo da AChE carbamilada de forma mais efetiva, e portanto, são os melhores reativadores da enzima inibida por carbofurano. O K033 interagiu com os resíduos do sítio ativo de maneira menos efetiva que os outros compostos, dessa forma, ele é o composto com menos potencial de reativação para *MmAChE-CB*.

### 5.3.2 Mecanismo de reação

Foi realizado o mesmo procedimento descrito para os sistema 1 (*MmAChE*) e 2 (*HsAChE*) para o estudo do mecanismo de reação. Na Tabela 11 é possível observar que as reações de reativação feita pelas oximas K033 e HS-6 na *MmAChE* inibida por carbofurano têm barreira de energia menor e maior, respectivamente. O composto K033, que apresentou um valor relativo de energia de ativação menor que os outros compostos, é o mais reativo entre eles no caso da *MmAChE* inibida por carbofurano.

Tabela 11 Energias relativas de ativação.

Ligante	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Frequencia cm <sup>-1</sup>
HS-6	1,2806	i343,15
HLö-7	0,3051	i316,93
K005	0,3001	i330,82
Metoxima	0,2441	i310,00
HI-6	0,2306	i366,37
BI-6	0,1786	i326,14
K033	0,0	i318,48

$${}^b\Delta\Delta E^\ddagger = E_{LIG2} - E_{LIGi}$$

A melhor reatividade do composto K033 poder ser devido às duas interações que ele realizou com o resíduo de Arg296, o qual ajuda a estabilizar o estado de transição por meio de interações eletrostáticas. Além disso, o K033 interagiu com o resíduo de Ser203, o resíduo carbamylado. Já a maior estabilidade do composto BI-6 no sítio ativo pode ser explicada pela interação  $\pi$ - $\pi$  *stacking* que ele realizou com os resíduos Tyr124 e Trp286, como pode ser observado na Figura 55. Portanto, os dados teóricos apontam os compostos BI-6 e K033 como os melhores reativadores de *Mm*AChE inibida por carbofurano.

#### 5.4 *Hs*AChE inibida por carbofurano

Os resultados de ancoramento molecular e mecanismos de reação para o sistema de *Hs*AChE inibida por carbofurano estão descritos nos subitens abaixo.

### 5.4.1 Ancoramento molecular

A identidade sequencial entre as enzimas *MmAChE* e *HsAChE*, como já foi mostrado, é de 88,5% e os resíduos do sítio ativo são 100% conservados. Desta forma, as coordenadas do composto carbofurano e da oxima cristalizada na enzima *MmAChE* (*MmAChE*-CB, enzima usada nos estudos do sistema 3) puderam ser utilizadas para inibir a *HsAChE*, uma vez que as enzimas foram sobrepostas e colocadas nas mesmas coordenadas. Posteriormente, foi feita a ligação covalente entre o carbofurano e o resíduo Ser203 da *HsAChE*, a fim de obter a *HsAChE* inibida pelo carbofurano.

O volume da cavidade calculado no *MVD* foi de 46,59 Å<sup>3</sup> e está representado na Figura 56, juntamente com a oxima HI-6 e o agente neurotóxico carbofurano.

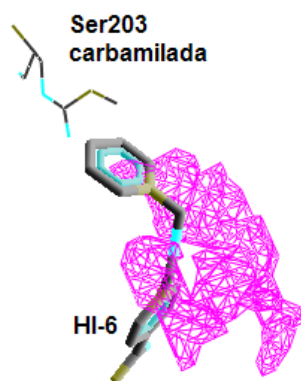


Figura 56 Cavidade (rosa) da enzima *HsAChE*, com a oxima HI-6 e o agente neurotóxico carbofurano ancorados. Para melhor visualização omitiu-se a proteína

O volume da cavidade para a *HsAChE*-CB, é menor que para a *MmAChE*-CB, assim como observado nos estudos com AChE de camundongo e humana inibidas por OP. Provavelmente, essa diferença de volumes de cavidade

entre as enzimas de camundongo e humana ocorre em função da diferença de conformação do resíduo de Trp286 nas duas enzimas (Figura 42).

Os reativadores foram ancorados no sítio ativo da *HsAChE* inibida pelo carbofurano e sobrepostos na oxima cristalizada dentro da enzima. Como no estudo dos sistemas anteriores, as energias de interação intermolecular ligante-proteína foram calculadas para melhor entender quais são as variações entre os modos de interação dos compostos no sítio ativo da enzima e verificar quais os fatores são responsáveis pela atividade dos reativadores. Os valores de energia de interação intermolecular entre as oximas e a proteína podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12 Valores de energia de interação intermolecular ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) proteína/inibidores obtida do ancoramento.

<b>COMPOSTOS</b>	<b>ENERGIA DE INTERAÇÃO</b>
<b>Metoxima</b>	-133,62
<b>HLö-7</b>	-133,28
<b>K005</b>	-132,03
<b>BI-6</b>	-130,26
<b>K033</b>	-126,05
<b>HS-6</b>	-124,60
<b>HI-6</b>	-124,50

De acordo com a Tabela 12, o composto metoxima apresentou um menor valor de energia de interação intermolecular, ou seja, possui interação mais efetiva com o sítio ativo da *HsAChE* inibida por CB, sugerindo que tenha um maior potencial de reativação para este sistema enzimático. Já o composto HI-6 apresentou um valor energia de interação intermolecular maior, sugerindo que ele forme um complexo menos estável com a enzima quando comparado aos outros compostos.

Na Figura 57, observa-se as conformações assumidas por cada uma das oximas após o ancoramento molecular, e a posição delas em relação ao cristal, e na Tabela 13 são apresentados os valores de energia e o comprimento de cada ligação hidrogênio formada entre os respectivos resíduos de aminoácidos e cada reativador.



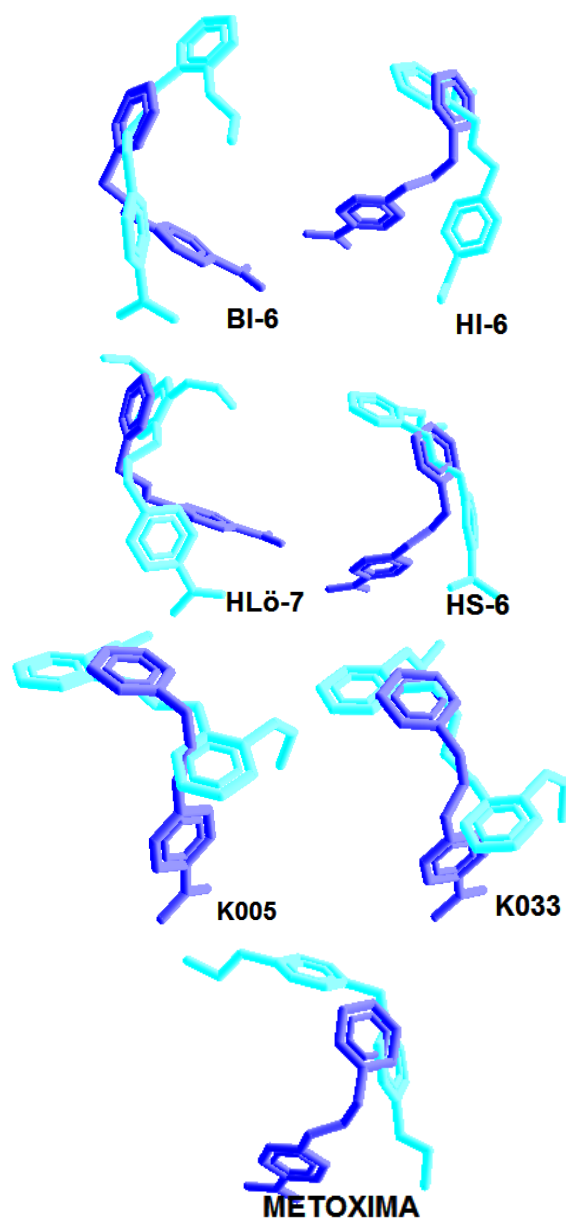


Figura 57 Sobreposição dos reativadores depois do ancoramento. A Oxima cristalizada está representada em azul e os respectivos reativadores indicados nas figuras, estão representados em azul claro

A escolha das melhores conformações foi feita levando-se em consideração a conformação do cristal de HI-6, e principalmente, a proximidade entre a hidroxila da oxima, e a carbonila do carbofurano. Assim, como pode ser observado na Figura 57, as conformações das oximas não ficaram bem sobrepostas no cristal.

Tabela 13 Valores do comprimento dos ângulos (Å) das ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio (kcal mol<sup>-1</sup>) e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores e a enzima.

<b>Compostos</b>	<b>Comprimento de ligação (Å)</b>	<b>Energia de ligação de hidrogênio (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Resíduos de aminoácidos</b>
<b>K005</b>	2,48	-1,00	Phe295
	3,34	-1,30	Arg296
	3,28	-1,58	Arg296
	2,94	-2,50	Tyr124
	3,00	-2,50	Carbofurano
<b>HI-6</b>	2,65	-2,50	Ser293
	3,29	-1,55	Arg296
	3,26	-1,65	Tyr124
	2,85	-2,50	Tyr124
	2,48	-1,53	Tyr124
	2,79	-2,06	Carbofurano
<b>Metoxima</b>	3,05	-2,50	Tyr72
	3,21	-0,02	Asp74
	3,51	-0,18	Asp74
	2,59	-2,45	Ans87
	3,16	-2,20	Ser125
	3,03	-2,50	Tyr124
	3,08	-2,50	Tyr124
	3,10	-2,45	Phe295

Tabela 13, Continuação

<b>Compostos</b>	<b>Comprimento de ligação (Å)</b>	<b>Energia de ligação de hidrogênio (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Resíduos de aminoácidos</b>
<b>K033</b>	3,41	-0,94	Ser293
	2,91	-2,50	Arg296
	3,41	-0,93	Arg296
	2,55	-0,73	Phe295
	3,15	-2,23	Tyr124
	2,67	-2,18	Carbofurano
<b>HS-6</b>	2,96	-2,50	Tyr341
	3,19	-2,01	Ser293
	2,51	-1,75	Tyr124
	2,96	-2,50	Tyr124
	2,74	-2,50	Tyr124
	3,01	-1,72	Carbofurano
<b>HLö-7</b>	2,99	-2,50	Ser293
	3,30	-1,47	Phe295
	3,35	-1,21	Gly122
	3,49	-0,55	Tyr341
	3,11	-2,46	Tyr337
	3,35	-0,75	Carbofurano
<b>BI-6</b>	2,84	-2,5	Ser293
	2,73	-2,5	Arg296
	3,04	-2,5	Tyr124
	3,56	-0,01	Carbofurano
	3,55	-0,02	Carbofurano

Por meio da Tabela 13 pode-se observar que os compostos BI-6 e K005 são os que fazem menor número de ligações de hidrogênio. O composto K005 apresenta 5 interações, os compostos K033, HS-6, HI-6 e HLö-7 apresentam 6 interações e o composto metoxima apresenta 7 interações com os aminoácidos do sítio ativo.

As ligações mais estáveis do composto K005 são com o resíduo de aminoácido Tyr124 e com o inibidor carbofurano. Elas podem ser observadas na Figura 58.

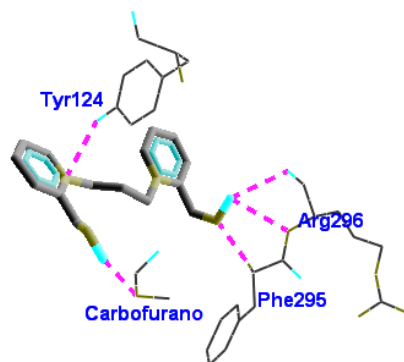


Figura 58 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador K005 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-CB*

Na Figura 59 é possível observar as ligações de hidrogênio feitas entre o reativador HI-6 e os resíduos de aminoácidos. As interações com menor valor de energia são realizadas com os resíduos Ser293 e Tyr124.

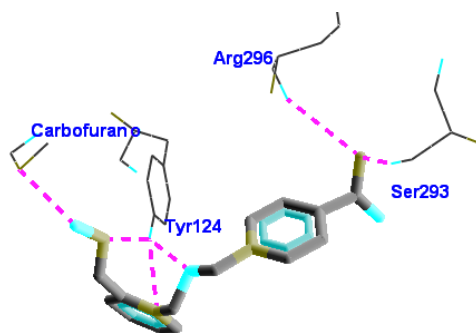


Figura 59 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-CB*

Já para o composto metoxima as interações mais estáveis são feitas com o resíduo Tyr124. Estas e as outras ligações de hidrogênio formadas com este composto podem ser observadas na Figura 60.

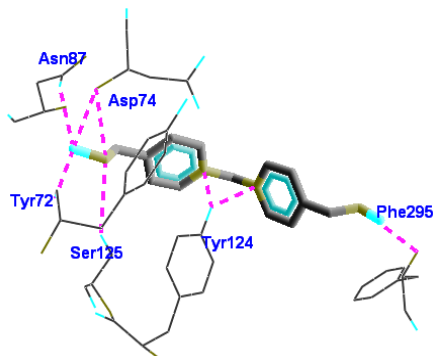


Figura 60 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador metoxima ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-CB*

O reativador K033 apresenta interação de menor energia com o resíduo Arg296, e o reativador HS-6 com os resíduos Tyr341 e Tyr124 (Figuras 61 e 62). O reativador HLö-7 interage de forma mais efetiva com o resíduo de Ser293 (Figura 63), já o composto BI-6 interage mais fortemente com os resíduos de Tyr124, Arg296 e Ser293, e suas interações podem ser observadas na Figura 64.

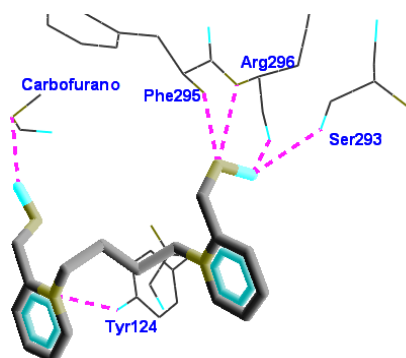


Figura 61 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador K033 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-CB*

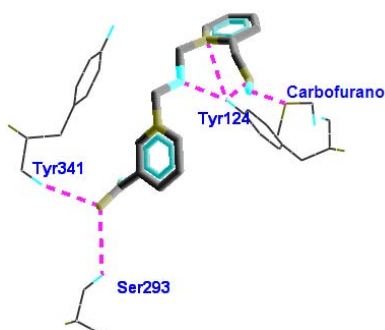


Figura 62 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HS-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-CB*

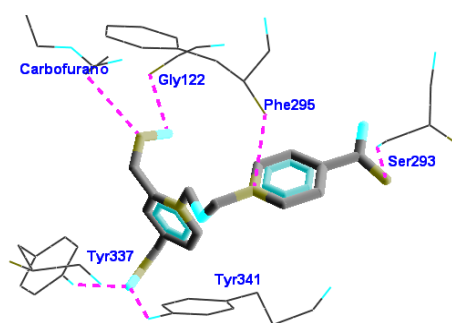


Figura 63 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador HLö-7 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-CB*

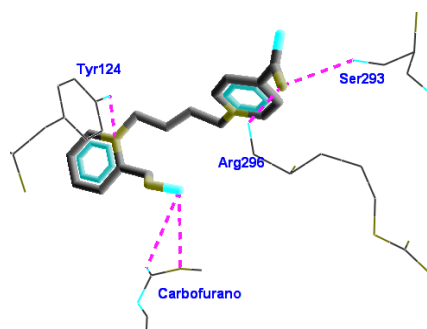


Figura 64 Ligações de hidrogênio formadas entre o reativador BI-6 ancorado e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *HsAChE-CB*

Os resultados dos estudos de ancoramento molecular apontam as oximas metoxima e HLö-7 como bons reativadores da enzima inibida por carbofurano, do ponto de vista do ancoramento molecular. O HI-6 interagiu com os resíduos do sítio ativo de maneira menos efetiva que os outros compostos, dessa forma, ele é o composto com o menor potencial de reativação para a *HsAChE-CB*.

O reativador metoxima foi o único que fez interações com o resíduo de Asp74, podendo realizar interações eletrostáticas que ajudam e estabilizar o composto no sítio ativo da enzima. E ainda interagiu com a Phe295, assim como o HLö-7, que se mostrou o segundo mais estável no sítio ativo.

#### 5.4.2 Mecanismo de reação

Foi realizado o mesmo procedimento descrito para os sistema 1 (*MmAChE-OP*), 2 (*HsAChE-OP*) e 3 (*MmAChE-CB*) para o estudo do mecanismo de reação. Na Tabela 14 é possível observar que a reação de reativação da oxima K005 na *HsAChE* inibida por carbofurano tem a menor barreira de energia, sugerindo que ela seja a mais reativa. O composto HS-6

apresentou o maior valor relativo de energia de ativação, portanto, é o menos reativo em *HsAChE*-CB dentre os compostos, assim como em *MmAChE*-CB.

Tabela 14 Energias relativas de ativação

Ligante	$\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Frequencia cm <sup>-1</sup>
<b>HS-6</b>	46,48	i120,16
<b>Metoxima</b>	45,64	i71,17
<b>HLö-7</b>	7,19	i183,13
<b>HI-6</b>	7,17	i57,80
<b>K033</b>	7,13	i111,33
<b>BI-6</b>	7,07	i82,45
<b>K005</b>	0,0	i150,49

$${}^b\Delta\Delta E^\ddagger = E_{LIG2} - E_{LIGi}$$

O K005 é o composto que interage mais fortemente com o inibidor carbofurano (valor de energia de ligação de hidrogênio igual a -2,50 kcal mol<sup>-1</sup>), favorecendo a reação de reativação. Além disso, ele interagiu com Arg296, um resíduo que pode realizar interações eletrostáticas, e com o Phe295 podendo fazer interação cátion- $\pi$ , contribuindo com a estabilização do estado de transição. De acordo com os dados obtidos, sugere-se as oximas K005, metoxima e HLö-7, como os melhores reativadores para este sistema enzimático, embora a oxima BI-6 também tenha apresentado um bom resultado para o ancoramento molecular, e o segundo melhor resultado para o mecanismo de



reação. De maneira geral, em sistemas de *MmAChE* e *HsAChE*, inibidas por carbofurano, as oximas HLö-7 e BI-6 mostraram-se eficazes.

Na busca por uma oxima “universal”, eficiente tanto em casos de intoxicação por organofosforados como por carbamatos, avaliou-se de forma geral os resultados obtidos nos quatro diferentes sistemas estudados. Os dados obtidos nos estudos de AChE (*MmAChE* e *HsAChE*) inibida por carbofurano, para os compostos BI-6, metoxima e K033 foram satisfatórios, e os apontam como bons reativadores para estes sistemas, entretanto, os compostos que se destacaram com bons resultados de *docking* e mecanismo de reação, em todos os sistemas enzimáticos foram as oximas K005 e HLö-7. Neste sentido, sugere-se que a oxima com atividade mais abrangente (Figura 44), tenha sua estrutura baseada destes compostos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A boa correlação obtida entre os dados teóricos de ancoramento molecular ( $R^2$  igual 0,929) e experimentais de constante de dissociação do complexo enzima inibida-reativador e resultados teóricos de energia de ativação e constante da taxa de reação de reativação (KASSA et al., 2007) para o mecanismo de reação ( $R^2$  igual a 0,822), na *Mm*AChE valida as metodologias de *docking* e mecanismo de reação como adequadas para os sistemas estudados, e capazes de prever qualitativamente a afinidade e reatividade.

Em princípio, devido à alta identidade sequencial (88,5%) entre a enzima de camundongo e a enzima humana, e levando-se em consideração que 100% dos resíduos do sítio ativo são conservados, foi possível inibir a enzima humana com o ciclosarin, a partir das coordenadas cristalinas do OP contido na enzima de camundongo. E desta forma, realizar os estudos de *docking* das oximas em estudo, nas enzimas (*Mm*AChE e *Hs*AChE) inibidas por ciclosarin, e ainda, correlacionar os dados teóricos com os dados experimentais descritos por Kassa et al. (2007).

Uma vez que as metodologias foram validadas, foi possível realizar estudos teóricos de *docking* e mecanismo de reação, também para as enzimas de camundongo e humana inibidas pelo composto CB carbofurano.

Dentre as oximas estudadas como reativadores de AChE, tanto de camundongo quanto humana inibidas por ciclosarin, foi selecionada como mais estável no sítio ativo das enzimas (e portanto que apresentou menores valores de interação intermolecular) a oxima K005. A partir dos estudos de mecanismo de reação, a oxima HLö-7 foi selecionada como a mais reativa no processo de reativação da enzima inibida por ciclosarin, em ambos sistemas enzimáticos. Portanto, sugere-se essas oximas como potenciais protótipos de reativadores de AChE inibida por ciclosarin.

Para as enzimas (*Mm*AChE e *Hs*AChE) inibidas por carbofurano, a oxima selecionada com maior afinidade pelo sítio ativo de ambas, foi a HLö-7. Porém para a *Mm*AChE-CB, a oxima mais reativa foi a K033, e para a *Hs*AChE, a K005. É importante observar que as estruturas dos compostos K033 e K005 são muito semelhantes, variando apenas em um átomo de carbono entre os anéis pirimidínicos.

Com os resultados obtidos para os sistemas enzimáticos inibidos por ciclosarin, aliados aos resultados obtidos para os sistemas inibidos por carbofurano, sugeriu-se que as oximas K005 e HLö-7 são potenciais protótipos de reativadores de AChE inibida tanto por organofosforados, quanto por carbamatos. Portanto, sugere-se uma possível oxima mais efetiva e com atividade mais abrangente, baseada nas estruturas destes dois compostos. Como perspectiva deste trabalho, pretende-se realizar estudos de *docking* e mecanismo de reação para a oxima proposta nos diferentes sistemas de AChE.

Observou-se que quase todas as oximas em todos os sistemas enzimáticos estudados, interagiram com o resíduo de Tyr124, sendo este, um resíduo importante na estabilização do reativador no sítio ativo da enzima.

Observou-se também, que a cadeia lateral do resíduo Trp286 do sítio ativo nas enzimas de camundongo e humana, assume conformações diferentes, interferindo nos resultados. Porém, acredita-se que esta diferença de conformação do Trp286 se dá devido ao processo de cristalização da enzima, na ausência ou na presença de uma oxima, uma vez que na *Mm*AChE cristalizada sem uma oxima no interior do seu sítio ativo, apresenta a cadeia lateral do resíduo de Trp286 similar à conformação observada na *Hs*AChE (também sem uma oxima), e diferente da conformação observada na *Mm*AChE cristalizada na presença da oxima HI-6. Para confirmação desta hipótese, tem-se como perspectiva deste trabalho a realização de estudos de dinâmica molecular.

## 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, Aug. 2006.

ALDRIDGE, W. N.; REINER, E. **Enzyme inhibitors as substrates**. Amsterdam: North-Holland, 1972. 328 p.

BARAK, D. et al. Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. **Journal of Biology Chemical**, Washington, v. 269, n. 9, p. 6296-6305, Mar. 1994.

BAR-ON et al. Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. **Biochemistry**, New York, v. 41, n. 11, p. 3555-3564, Feb. 2002.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry: 3., the role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, Amsterdam, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, Apr. 1993.

BERMAN, H. A.; LEONARD, K. Ligand exclusion on acetylcholinesterase. **Biochemistry**, New York, v. 29, n. 47, p. 10641-10649, Aug. 1990.

BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL. Disponível em:  
<<http://au.expasy.org>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

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

BOURNE, H. R. et al. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell*, Cambridge, v. 114, p. 201-214, July 2003.

BRANCH, R. A. Jacqz E. subacute neurotoxicity following long-term exposure to carbaryl. *American Journal of Medicine*, New York, v. 80, n. 4, p. 741-745, Apr. 1986.

BURGESS, J. L.; BERNSTEIN, J. N.; HURLBUT, K. Aldicarb poisoning: a case report with prolonged cholinesterase inhibition and improvement after pralidoxime therapy. *Archives International of Medicine*, London, v. 154, n. 2, p. 221-224, Feb. 1994.

CARPENTER, C. P. Insecticide toxicology, mammalian toxicity of 1-naphthyl-N- methylcarbamate (Sevin insecticide). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Easton, v. 9, n. 1, p. 30-39, 1961.

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/jun. 2003.

CASARETT, L. J.; KLASSEN, L.; DOULLS, P. **Toxicology**: the basic science of poisons. 5<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1996. 768 p.

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.

DISCOVERY STUDIO. **Accelrys software**. San Diego, 2009. Software.

ECKERT, S. C. et al. Comparison of the oxime-induced reactivation of erythrocyte and muscle acetylcholinesterase following inhibition by sarin or paraoxon, using a perfusion model for the real-time determination of membrane-bound acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 75, p. 698-703, Sept. 2008.

EDDELSTON, M. et al. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. **Quarterly Journal of Medicine**, Cambridge, v. 95, p. 275-283, Feb. 2002.

EKINS, B. R.; GELLER, R. J. Methomyl-induced carbamate poisoning treated with pralidoxime chloride. **Western Journal of Medicine**, San Francisco, v. 161, n. 1, p. 68-70, July 1994.

ERDMAN, A. R. Pesticides-insecticides. In: DART, R. C. (Ed.). **Medical toxicology**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p. 1487-1492.

EYER, P. A.; WOREK, F. Oximes. In: MARRS, T. C.; MAYNARD, R. L.; SIDELL, F. R. (Ed.). **Chemical warfare agents: toxicology and treatment**. 2<sup>nd</sup> ed. West Sussex: J. Wiley, 2007. p. 305-329.

FARAGO, A. Fatal suicidal case of Sevin (1-naphthyl-N-methyl- carbamate) poisoning. **Archiv fur Toxikologie**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 309-315, 1969.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Principles of medicinal chemistry**. 4<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. 995 p.

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

FRIBOULET, A. et al. Interaction of an organophosphate with a peripheral site on acetylcholinesterase. **Biochemistry**, New York, v. 29, n. 4, p. 914-920, Jan. 1990.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 98, revision A.11**. Pittsburg: Gaussian, 2001. Software.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacological Research**, London, v. 50, p. 433-440, Nov. 2004.

GIBNEY, G. et al. Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. **Proceeding of National Academy Science of the United State America**, Washington, v. 87, p. 7546-7550, Oct. 1990.

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

GONÇALVES, A. S. et al. Molecular dynamics of the interaction of pralidoxime and deazapralidoxime with acetylcholinesterase inhibited by the neurotoxic agent tabun. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 17, n. 5, p. 968-975, Sept./Oct. 2006.

GRINGAUZ, A. **Introduction to medicinal chemistry: how drugs act and why**. New York: Wiley, 1997. 721 p.

GUEx, N. M. C. Peitsch, swiss-model and Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, Dec. 1997.

HAREL, M. et al. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proceeding of National Academy Science of the United State America**, Washington, v. 90, p. 9031-9035, Oct. 1993.

HARRIS, L. W. et al. The relationship between oxime-induced reactivation of carbamylated acetylcholines- terase and antidotal efficacy against carbamate intoxication. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 98, n. 1, p. 128-133, Mar. 1989.

HEHRE, W. J.; DEPPMEIER, B. J.; KLUNZINGER, P. E. **PC Spartan Pro**. Wavefunction: Irvine, 1999. Software.

HILLISCH, A. et al. Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 18, n. 7, p. 1599-1609, July 2004.

HOBBIGER, S. Effect of nicotinhydroxamic acid methiodide on human plasma cholinesterase inhibited by organophosphates containing a dialkylphosphato group. **British Journal Pharmacology**, Oxford, v. 10, p. 356-360, May 1955.

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**, New York, v. 46, n. 16, p. 4815-4825, Feb. 2007.

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, Sept. 2007.

KOHN, W.; HOLTHAUSEN, M. C. **A chemist's guide to density functional theory**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley, 2001. 293 p.

KOVARIK, Z. et al. Oximes: reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase and antidotes in therapy against tabun poisoning. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 175, p. 173-179, May 2008.



KUHR, R. J.; DOROUGH, H. W. **Carbamate insecticides**: chemistry, biochemistry and toxicology. Cleveland: CRC, 1976. 70 p.

KUMOSINSKI, T.; LIEBMAN, M. N. **Molecular modeling**: from virtual tools to real problems. Denver: ACS, 1994. 530 p. (ACS Serie, 576).

KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, Dordrecht, v. 161, n. 2, p. 269-288, Oct. 1982.

LEACH, P. G. L.; ZNOJIL, M. On the elementary schrodinger bound-states and their multiplets. **Journal of Mathematical Physics**, New York, v. 33, n. 8, p. 2785-2794, Apr. 1992.

LEE, S. G.; CHUNG, Y. C. Molecular dynamics investigation of interfacial mixing behavior in transition metals (Fe, Co, Ni)-Al multilayer system. **Journal of Applied Physics**, New York, v. 105, n. 3, p. 34902-34906, Feb. 2009.

LEVINE, R. D. et al. Memorial issue on molecular-dynamics: introduction. **Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 95, n. 21, p. 7961-7961, Oct. 1991.

LIESKE, C. N. et al. Studies of the amplification of carbaryl toxicity by various oximes. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 62, n. 2/3, p. 127-137, June 1992.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemistry in drug discovery then and now. **Nature Reviews, Drug Discovery**, London, v. 3, n. 10, p. 853-862, Oct. 2004.

MAIN, A. R. **Biology of cholinergic function**. New York: Raven, 1976. 353 p.

MERCURIO-ZAPPALA, M. et al. Pralidoxime in carbaryl poisoning: an animal model. **Human and Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 26, n. 2, p. 125-129, Apr. 2007.

MIZUTANI, M.; NIWA, T.; TANAKA, S. On the law of entropy increasing of a one-dimensional infinite system II. **Journal of Mathematics of Kyoto University**, Kyoto, v. 34, n. 4, p. 699-708, Sept. 1994.

MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, R. The density-functional theory. **Química Nova**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 44-55, jan./fev. 1995.

MUNRO, N. B. et al. As fontes, destino e toxicidade dos produtos de degradação de guerra química agente. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 107, n. 12, p. 933-938, Dec. 1999.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W.  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 9, n. 6, p. 732-737, June 1999.

NATOFF, I. L.; REIFF, B. Effect of oximes on the acute toxicity of anticholinesterase carbamates. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 569-575, 1973.

NELSON, L. S. et al. Aldicarb poisoning by an illicit rodenticide imported into the United States: Tres Pasitos. **Journal of Toxicology, Clinical Toxicology**, New York, v. 39, n. 5, p. 447-452, Sept. 2001.

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 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ORDENTLICH, A. et al. Architecture of human acetylcholinesterase active center probed by interactions with selected organophosphate inhibitors. **Journal of Biology Chemical**, Washington, v. 271, n. 20, p. 11953-11962, May 1996.

\_\_\_\_\_. Contribution of aromatic moieties of tyrosine 133 and of the anionic subsite tryptophan 86 to catalytic efficiency and allosteric modulation of acetylcholinesterase. **Journal of Biology Chemical**, Washington, v. 270, n. 5, p. 2082-2091, Feb. 1995.

\_\_\_\_\_. Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity: identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. **Journal of Biology Chemical**, Washington, v. 268, n. 23, p. 17083-17095, Aug. 1993a.

\_\_\_\_\_. Engineering resistance to 'aging' of phosphylated human acetylcholinesterase role of hydrogen bond network in the active center. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 334, n. 2, p. 215-220, Nov. 1993b.

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

PATRICK, D. L.; FLANAGAN, J. Contact mechanics and bond rupture in chemical force microscopy: a study using atomistic molecular dynamics simulation. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, San Diego, v. 221, n. 1, p. U341-U341, Apr. 2001.

PROTEIN DATA BANK. **Biological macromolecular resource**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

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

RAMALHO, T. C.; CUNHA, E. F. F.; ALENCASTRO, R. B. A density functional study on the complexation of ethambutol with divalent cations. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 676, n. 1, p. 149-153, Feb. 2004.

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**, New York, v. 27, n. 2, p. 195-208, Oct. 2009.

\_\_\_\_\_. Development of new acetylcholinesterase reactivators: molecular modeling versus in vitro data. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 185, n. 1, p. 73-77, Feb. 2010.

\_\_\_\_\_. *Docking* simulations and QM/MM studies between isoniazid prodrug, catalase-peroxidase (KatG) and S315T mutant from mycobacterium tuberculosis. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 113-124, Jan. 2007.

RAMALHO, T. C.; TAFT, C. A. Thermal and solvent effects on the NMR and UV parameters of some bioreductive drugs. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 123, n. 5, p. 543191-543197, Oct. 2005.

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, Jan. 2009.

SANDERSON, D. M. Treatment of poisoning by anticholinesterase insecticides in the rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 13, p. 435-442, 1961.

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

SHAFFERMAN, A. et al. Functional requirements for the optimal catalytic configuration of the AChE active center. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 157/158, p. 123-131, Oct. 2005.

\_\_\_\_\_. Mutagenesis of human acetylcholinesterase: identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. **Journal of Biology Chemical**, Washington, v. 267, n. 25, p. 17640-17648, Sept. 1992.

SHIH, T.; KAN, R. K.; MCDONOUGH, J. H. In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 157, n. 8, p. 293-303, Dec. 2005.

SIDELL, F. R. Chemical warfare agents. In: KELLEY, P. W. (Ed.). **Military preventive medicine: mobilization and deployment**. Washington: Borden Institute, 1992. v. 1, p. 611-625.

SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. Medical aspects of chemical and biological warfare. In: \_\_\_\_\_. **Textbook of military medicine**. Washington: Office of the Surgeon General, 1997. p. 129-179.

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

SINGH, S. et al. Is atropine alone sufficient in acute severe organophosphorus poisoning: experience of a north-west indian hospital. **International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology**, Deisenhofen, v. 33, n. 11, p. 628-630, Nov. 1995.

SOBORG, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 128, n. 1/3, p. 215-228, Mar. 2002.

SOREQ, H. E. 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.

STERRI, S. H. et al. Effect of toxogonin and P2S on the toxicity of carbamates and organophosphorus compounds. **Acta Pharmacology Toxicology**, Copenhagen, v. 45, n. 1, p. 9-15, 1979.

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, p. 435-443, Aug. 2006.

SZABO, A.; OSTLUND, N. S. **Modern quantum chemistry**: introduction to advanced electronic structure theory. New York: Courier Dover, 1996. 466 p.

THOMAS, G. **Química medicinal**: uma introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413 p.

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

UMEHARA, F. et al. Polyneuropathy induced by m-tolyl methyl carbamate intoxication. **Journal of Neurology**, New York, v. 238, n. 1, p. 47-48, Jan. 1991.

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, p. 227-245, 1976.

WEINSTOCK, F. et al. **Advances in behavioral biology**. New York: Plenum, 1986. 539 p.

WESSELING, C. et al. Long-term neurobehavioral effects of mild poisonings with organophosphate and n-methyl carbamate pesticides among banana workers. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, Attleboro, v. 8, n. 1, p. 27-34, Feb. 2002.

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

\_\_\_\_\_. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 68, p. 237-2248, July 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Public health impact of pesticides used in agriculture**. Geneva, 1990. 128 p.

YANG, P. Y. et al. Carbofuran-induced delayed neuropathy. **Journal of Toxicology, Clinical Toxicology**, New York, v. 38, n. 1, p. 43-46, Jan. 2000.

ZIEGLER, T. Approximate density functional theory as a practical tool in molecular energetics and dynamics. **Chemical Reviews**, Washington, v. 91, n. 5, p. 651-667, July 1991.

## ANEXOS

### PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Docking studies and effects of *syn-anti* isomery of oximes derived from pyridine imidazol bicycled systems as potential human acetylcholinesterase reactivators. (Publicado)

2 Molecular Aspects of the Reactivation Process of Acetylcholinesterase Inhibited by Cyclosarin. (Publicado)

3 Molecular modeling studies on Nucleoside Hydrolase from the biological warfare agent *Brucella suis*. (Aceito para publicação)

4 First principles calculations of thermodynamics and kinetic parameters of Acetyl cholinesterase reactivators: can mouse data provide new insights into humans? (Submetido)

5 QSAR and docking studies of HCV NS3 serine protease inhibitors. (Submetido)



## ORIGINAL ARTICLE

## Docking studies and effects of *syn-anti* isomery of oximes derived from pyridine imidazol bicycled systems as potential human acetylcholinesterase reactivators

Ana Paula Guimarães<sup>1,2</sup>, Tamos Celmar Costa França<sup>1</sup>, Teodorico Castro Ramalho<sup>3</sup>,  
Magdalena Nascimento Rennó<sup>1</sup>, Elaine Fontes Ferreira da Cunha<sup>1</sup>, Karina Silvia Matos<sup>2</sup>,  
Daiana Teixeira Mancini<sup>2</sup>, Kamil Kuča<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Modeling Applied to the Chemical and Biological Defense – Military Institute of Engineering, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Chemistry Department – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil

<sup>3</sup>Pharmacy Faculty – Federal University of Rio de Janeiro – Campus Macaé, Macaé, RJ, Brazil

<sup>4</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové,

<sup>5</sup>University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Received 15<sup>th</sup> November 2010.

Revised 10<sup>th</sup> February 2011.

Published online 7<sup>th</sup> April 2011.

### Summary

In order to contribute to a better understanding of the mechanism of action of oximes, we evaluated the affinities of 10 new oximes, derived from pyridine-imidazol bicycled systems, for human acetylcholinesterase (*HsAChE*) complexed with tabun, by estimating their docking energy values and comparing of the values obtained to known oximes using the software Molegro Virtual Docker (MVD)<sup>®</sup>. We evaluated the influence of the position of the oxime group as substituent in the structures and, also, the influence of the oxime group *syn-anti* isomery on the docking score values for all the molecules studied. Results suggest that: the affinities of the 10 new oximes for the tabun inhibited *HsAChE* active site are better than pralidoxime's and similar to trimedoxime's; the *meta*-pralidoxime could have more affinity for the *HsAChE* active site and the oximes' *anti* isomers could present slightly better affinities for the *HsAChE* active site than the *syn* isomers.

**Key words:** acetylcholinesterase; docking studies; oximes; neurotoxic agents; theoretical calculation

### INTRODUCTION

Despite the existence of many different oximes in use today against intoxication with neurotoxic agents, the

literature has not yet reported one able to act effectively against all the existing neurotoxic agents and oximes usually effective with one specific nerve agent can be completely ineffective with another. This probably happens because their mechanisms of action are not yet well elucidated (Ekström et al. 2007). In addition, other relevant factors: the adequate orientation of the phosphoryl bond inside the active site, the most suitable oxime charge, the most adequate angles for attacking the phosphorylated serine, the influence of the oxime's isomery, and the chemical environment of the oxime group, remain unknown despite the fact that they are recurrent issues in the literature (Bay et al. 1958, Smirnova et al.

✉ Teodorico Castro Ramalho, Chemistry Department – Federal University of Lavras – Campus Universitário, 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brazil  
teo@dqi.ufla.br  
☎ (+55) 35- 3829-1891  
☎ (+55) 35- 3829-1271



### Molecular Aspects of the Reactivation Process of Acetylcholinesterase Inhibited by Cyclosarin

Karina S. Matos,<sup>a</sup> Daiana T. Mancini,<sup>a</sup> Elaine F. F. da Cunha,<sup>a</sup> Kamil Kuča,<sup>b,c</sup>  
 Tanos C. C. França<sup>a,d</sup> and Teodorico C. Ramalho<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Chemistry Department, Federal University of Lavras, Lavras-MG, Brazil

<sup>b</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences UO, University of Defence, Czech Republic

<sup>c</sup>University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

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

No presente trabalho foi aplicada uma metodologia teórica desenvolvida em um trabalho anterior que utiliza os programas Molegro<sup>®</sup> e Spartan<sup>®</sup> para avaliar as constantes cinéticas de associação e reativação de oximas, em relação a resultados *in vitro* previamente reportados na literatura. Como observado antes, os resultados mostraram boa correlação entre as energias livres teóricas de ligação das oximas e os dados experimentais, corroborando a metodologia como adequada para a predição de parâmetros cinéticos e termodinâmicos, os quais podem ser úteis para o planejamento e seleção de novas e mais efetivas oximas.

In this work we applied a theoretical methodology developed in a former work, using the Molegro<sup>®</sup> and Spartan<sup>®</sup> softwares, to evaluate the association and kinetic reactivation constants of oximes, facing *in vitro* data previously reported in the literature. As reported before, results showed a good agreement between the theoretical binding free energies of the oximes and experimental data, corroborating the methodology as suitable for the prediction of kinetic and thermodynamic parameters that might be helpful for the design and selection of new and more effective oximes.

Keywords: acetylcholinesterase, QMMM, chemical mechanism of reactivation, neurotoxic agents

#### Introduction

The action of the nerve agents<sup>1,2</sup> as inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) stops the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine and can lead to an irreversible inhibition of this enzyme (aging) thus triggering the cholinergic syndrome.<sup>3</sup> To avoid this it's necessary a nucleophile, like an oxime, whose hydroxyl group is believed to be able to remove the nerve agent from the active site and reactivate AChE (Scheme 1). This reactivation reaction (illustrated in equation 1) involves, first, the association of the oxime to the inhibited enzyme (EIOx) and then the reactivation of the enzyme by the leaving of the oxime complexed to the neurotoxic agent (I-Ox).<sup>4,5</sup>



Where  $K_2$  and  $k_1$  are the dissociation 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.<sup>4,5</sup>

The literature reports many structurally different oximes able to perform the reactivation of AChE inhibited by several different nerve agents, but one structure able to act efficiently against all the existing neurotoxic agents has not yet been reported<sup>4,5</sup> and oximes that are efficient against one specific nerve agent can be completely ineffective with another.<sup>2,6</sup> Several molecular modelling studies available in literature point out to important features on the oximes structures that could be very useful to guide experimental research on this issue.<sup>7-10</sup> In a former work<sup>4</sup> we have

\*e-mail: tmcos@ime.ufal.br, teo@dq.ufal.br

**Molecular modeling studies on Nucleoside Hydrolase from the biological warfare agent *Brucella suis***

Daisna T. Mancini<sup>1</sup>, Karina S. Matos<sup>1</sup>, Elaine F. F. Cunha<sup>1</sup>, Tamiris M. Assis<sup>1</sup>,  
Ana P. Guimarães<sup>2</sup>, Tano C. C. França<sup>2\*</sup>, Teodorico C. Ramalho<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Chemistry Department, Federal University of Lavras – Campus Universitário – UFLA,  
Lavras/MG, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Modeling Applied to Chemical and Biological Defense (LMCBD)  
Military Institute of Engineering – Rio de Janeiro/RJ, Brazil;

**Abstract**

*Brucella suis* is a dangerous biological warfare agent already used for military purposes. This bacteria cause brucellosis, a zoonosis highly infective and difficult to fight. An important selective target for chemotherapy against this disease is nucleoside hydrolase (NH), an enzyme still not found in mammals. We present here the first three-dimensional structure of *B. suis* Nucleoside Hydrolase (*Bs*NH) and propose this enzyme as a molecular target to the drug design in the fight against brucellosis. In addition we performed molecular docking studies, aiming to analyze the three-dimensional positioning of nine known inhibitors of *Chromidia fasciculata* NH (*Cf*NH) in the active sites of *Bs*NH and *Cf*NH. We also analyzed the main interactions of some of these compounds inside the active site of *Bs*NH and the relevant factors to biological activity. These results, together with further molecular dynamics (MD) simulations, pointed out to the most promising compound as lead for the design of potential inhibitors of *Bs*NH. Most of the docking and MD results corroborated to each other and the docking results also suggested a good correlation with experimental data.

**Keywords:**

*Brucella suis*; Nucleoside hydrolase; Homology modeling; Docking; Molecular Dynamics.

\*tanos@ima.eb.br; Tel: +005525467055; FAX: +005525467059

†teo@dqf.ufla.br; Tel: +00553538291891 FAX: +005538291271

## First principles calculations of thermodynamics and kinetic parameters of Acetyl cholinesterase reactivators: can mouse data provide new insights into humans?

Karina S. Matos<sup>a</sup>, Elaine F. F. da Cunha<sup>a</sup>, Kamil Kučička<sup>b,c</sup>

Taos C. C. Franca<sup>d</sup> and Teodorico C. Rasmalho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry – Federal University of Lavras – Campus Universitário  
37200-000, Lavras, MG, Brazil;

<sup>b</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences UO, University of Defence,  
Czech Republic.

<sup>c</sup>University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, 50005 Hradec Králové, Czech Republic.

<sup>d</sup>Laboratory of Molecular Modeling Applied to the Chemical and Biological Defense (LMCBD)  
Military Institute of Engineering – Rio de Janeiro, Brazil;

### Abstract

We have applied a theoretical methodology previously developed to evaluate the association and kinetic reactivation constants of oximes, comparing theoretical data obtained with human acetylcholinesterase (*HuAChE*) with *in vitro* results from *Mus musculus* AChE (*MuAChE*) previously reported in the literature. The results showed a good correlation between the theoretical and experimental data, supporting the methodology as appropriate for prediction of thermodynamic and kinetic parameters and corroborated *MuAChE* as a suitable model for studies with *HuAChE*.

**Keywords:** Acetylcholinesterase, QM/MM, Chemical Mechanism of reactivation, Neurotoxic agents.

**Corresponding author:** [\\*teo@doi.ufla.br](mailto:teo@doi.ufla.br); Tel: +00553538291891

## QSAR and docking studies of HCV NS3 serine protease inhibitors

Elaine F. F. da Cunha\*, Karina S. Matos and Teodorico C. Ramalho†

*Department of Chemistry, Federal University of Lavras*

*P.O. Box 3037*

*Lavras - MG - Brazil*

*37200-000*

### ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is a Hepacivirus that causes chronic liver disease, leading to hepatocellular carcinoma, cirrhosis, and chronic hepatitis in about 3% of the world population. In this study, novel HCV NS3 serine protease inhibitors based on 93 boceprevir analogues were studied by QSAR analyses using thermodynamic, structural and topological descriptors, including E-state descriptors. Novel compounds were proposed using the QSAR models. Both models were highly predictive, with calibration, leave-one-out validation and external validation R<sup>2</sup> of 0.66, 0.65 and 0.52, respectively. The most promising structures were docked onto the active site of HCV NS3 serine protease demonstrating the high affinity of some new structures.

\* [elaine\\_cunha@dqi.ufla.br](mailto:elaine_cunha@dqi.ufla.br)

† [teo@dqi.ufla.br](mailto:teo@dqi.ufla.br)