

**ESTUDOS DE REATIVADORES DE ACETILCOLINESTERASE INIBIDA PELO AGENTE
DE GUERRA QUÍMICA CICLOSARIN**

KARINA S. MATOS¹, ELAINE F. F. DA CUNHA²; TANOS C. C. FRANÇA³, TEODORICO C.
RAMALHO⁴

RESUMO

Ésteres do ácido fosfórico são potentes inibidores da enzima Acetilcolinesterase (AChE), pois promovem a fosforilação da hidroxila do resíduo serina responsável pela hidrólise da acetilcolina no sítio ativo dessa enzima. Esta reação pode ser revertida por uma oxima, que promove a desfosforilação da serina através de um ataque nucleofílico, reativando a enzima. Essa reativação ocorre em duas etapas: na primeira há a associação da oxima com a AChE inibida e na segunda ocorre a saída da oxima complexada com o neurotóxico. Neste trabalho estudou-se a interação de algumas oximas conhecidas no sítio ativo da AChE inibida por ciclosarin, por meio de ancoramento molecular (*docking*). Os resultados obtidos corroboraram com dados experimentais e estabeleceram uma tendência que pode ser útil na previsão de atividade de novas oximas como reativadores de AChE inibida por ciclosarin.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, Oximas, Ancoramento Molecular, Ciclosarin

A *AChE* é a enzima responsável pela terminação da transmissão dos impulsos nervosos em sinapses por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (*ACh*). Esta é uma função chave na regulação da transmissão dos impulsos nervosos que, se inibida, pode levar rapidamente à morte do indivíduo (Albuquerque et al., 2006). A inabilidade da AChE inibida em hidrolisar a Acetilcolina, leva a um acúmulo do neurotransmissor e, conseqüentemente, à super estimulação dos receptores colinérgicos, conhecida como síndrome colinérgica (Worek, et al., 2004). Os organofosforados conhecidos como agentes dos nervos, compostos químicos com bastante significância militar, são inibidores irreversíveis da AChE extremamente tóxicos e capazes de causar intoxicação severa ou a morte dos indivíduos expostos. Estes compostos são ésteres de ácido fosfórico, que agem como potentes inibidores da AChE, por meio da fosforilação do grupo hidroxila de um resíduo serina no sítio ativo da AChE que é diretamente responsável pela hidrólise da acetilcolina (Kryger, et al., 2000). A desfosforilação desse resíduo, chamada de reativação da AChE, é considerada o principal mecanismo de ação das oximas ou reativadores AChE. Recentes dados clínicos de pacientes intoxicados por pesticidas organofosforados fornecem fortes evidências para a validade desta hipótese (Worek et al., 2004). Esta reação de reativação acontece em duas etapas: (1) a associação da oxima com a AChE inibida, (2) a reativação da enzima pela saída da oxima complexada com o agente neurotóxico (Ramalho, et al., 2010).

Apesar da existência de muitas oximas em uso hoje em dia contra intoxicação por agentes neurotóxicos, não foi relatada ainda nenhuma oxima universal capaz de agir de forma eficaz contra todos os neurotóxicos existentes (Kassa, et al., 2007). Esse fato é o responsável pela limitada eficácia dos antídotos disponíveis atualmente contra intoxicação por agentes dos nervos e justifica a busca

¹ Mestranda em Agroquímica, Laboratório de Química Computacional – DQI/UFLA, karinasilva.matos@hotmail.com

² Professora Adjunta, Laboratório de Química Computacional – DQI/UFLA, elaine_cunha@dqi.ufla.br

³ Professor Nomeado, Laboratório de Modelagem Aplicada a Defesa Química e Biológica – IME/RJ tanos@ime.eb.br

⁴ Professor Adjunto, Laboratório de Química Computacional – DQI/UFLA, teo@dqi.ufla.br

constante por novas oximas bem como os estudos por modelagem molecular focados numa melhor compreensão do mecanismo de desinibição (Gonçalves, 2009).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as energias de interação de oximas conhecidas com resultados já reportados de atividade desinibitória, frente a AChE inibida pelo neurotóxico ciclosarin, com a finalidade de verificar as interações dessas oximas com os resíduos do sítio ativo da AChE e correlacionar os resultados obtidos com os resultados experimentais.

MATERIAL E MÉTODOS

O software PC Spartan Pro 08 foi utilizado para construir e otimizar as estruturas tridimensionais das oximas 1-6 (Figura 1). As energias de ancoramento (ΔE) dessas oximas na AChE inibida pelo agente GF (ciclosarin) foram avaliadas utilizando o software Molegro Virtual Docker 2006 (Thomsen & Christensen, 2006). Todas as principais interações e orientações dessas oximas ancoradas no sítio ativo da AChE inibida por GF foram investigadas e as poses com menores energias de interação e conformações mais ajustadas à conformação ativa da estrutura cristalina do PDB (código 2WHQ) foram selecionadas para análise posterior.

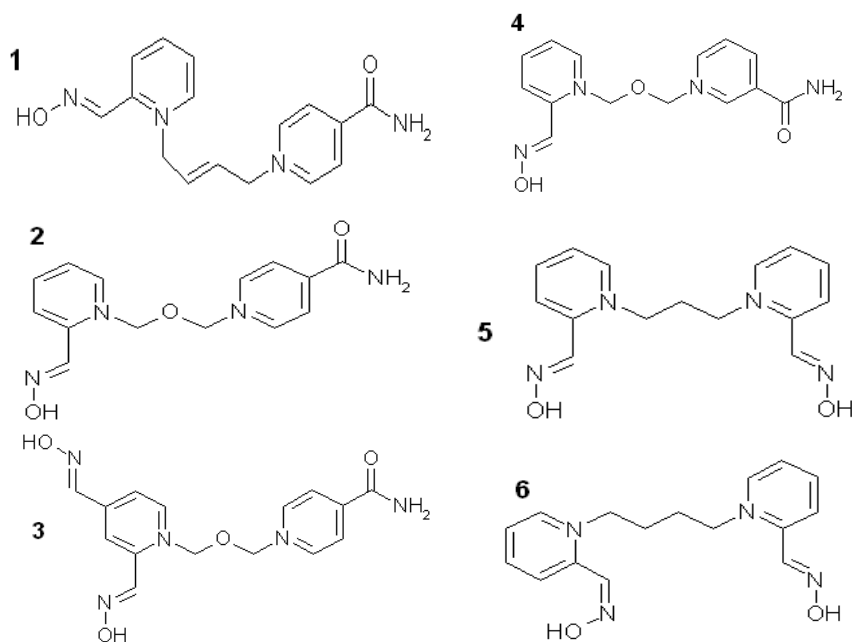


Figura 1. Oximas selecionadas para os estudos de *Docking*: (1) BI-6, (2) HI-6, (3) HLö-7, (4) HS-6, (5) K005, (6) K003.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já era esperado, todos os compostos apresentaram valores de energia de interação bastante baixos corroborando com os resultados experimentais que reportam essas oximas como reativadores da AChE inibida por GF. Os valores das energias de interação obtidos para essas moléculas são reportados na Tabela 1. A correlação com os dados experimentais segue a mesma tendência da Tabela 1 conforme pode ser observado no gráfico da Figura 2 cujo valor de R^2 é igual a 0.9803, e a equação da curva obtida após a regressão linear é $y = -149,016 - 0,8608 x$.

Tabela 1. Valores de energias intermoleculares estimadas (kcal.mol^{-1}) usadas para avaliação das melhores poses de *Docking*.

Ligante	pK_R^*	ΔE (kcal.mol^{-1})
K005	5,30	-153,630
HI - 6	4,92	-153,549
K003	4,70	-152,803
HS - 6	4,35	-152,728
HLö - 7	3,00	-151,443
BI - 6	1,00	-149,978

*Kassa, et al., 2007

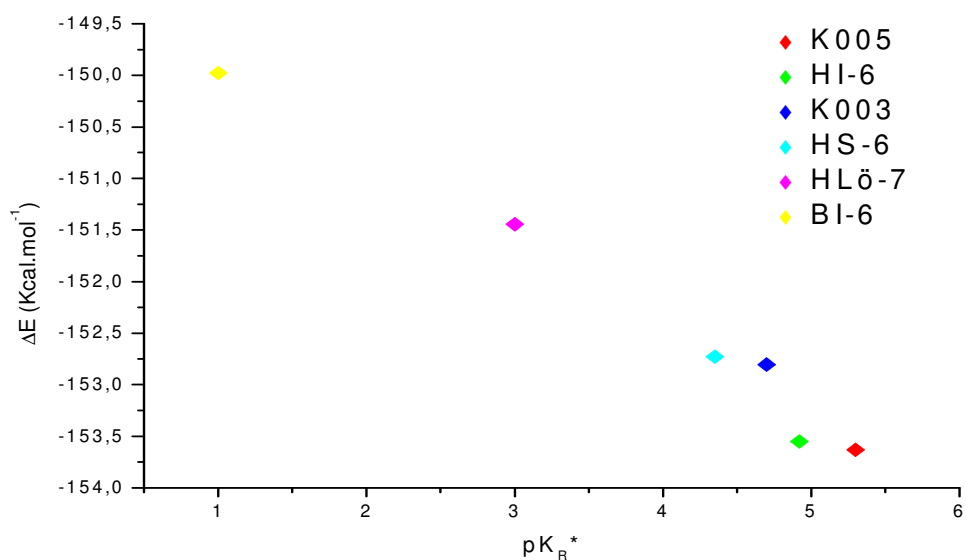


Figura 2. Valores de energias intermoleculares estimadas (kcal.mol^{-1}) e comparação com os dados experimentais (Kassa, et al., 2007).

Como já foi dito, os resultados teóricos seguem a mesma tendência dos resultados experimentais (Kassa, et al., 2007), ou seja, o composto K005 com maior valor de pK_R (5,30), apresentou o menor valor de energia, confirmando seu maior potencial reativador frente aos outros compostos em estudo. Já a oxima BI-6, apresentou o maior valor de energia intermolecular, corroborando novamente com os resultados experimentais, visto que seu valor de pK_R igual a 1,00 é o menor entre as oximas em questão. Além disso, o composto BI-6 fez o menor número de ligações de hidrogênio com o sítio ativo da enzima, provando mais uma vez, que este composto tem menor potencial de reativação da AChE inibida pelo agente Ciclosarin.

CONCLUSÃO

As energias de interação observadas corroboram com os resultados experimentais que apontam estas oximas como fortes reativadores de AChE inibida por Ciclosarin. Além disso, a boa correlação observada na Figura 2 confirma o processo de ancoragem adotado como adequado para este tipo de estudo e pode eventualmente ser utilizada para a previsão *in silico* das atividades de novas oximas como reativadores da AChE inibida por Ciclosarin.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALBUQUERQUE, E. X.; PEREIRA, E. F. R.; ARACAVAL, Y.; FAWCETT, W. P.; OLIVEIRA, M.; RANDALL, W. R.; HAMILTON, T. A.; KAN, R. K.; JR, J. A. R. AND ADLER, M. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. **PNAS**. v. 103, n. 35, p. 13221-13225, Jun. 2006.

GONÇALVES, ARLAN DA SILVA. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado Tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos**. 2009.206 f. Tese (Doutorado em ciências). UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências (Biofísica), Rio de Janeiro, 2009.

KASSA, J.; KUCA, K.; BARTOSOVA, L.; KUNESOVA, G. 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 **Curr. Org. Chem.** v. 11, p. 267-283, 2007.

KRYGER, G.; HAREL, M.; GILES, K.; TOKER, L.; VELAN, B.; LAZAR, A.; KRONMAN, C.; BARAK, D.; ARIEL, N.; SHAFFERMAN, A.; SILMAN, I. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. **J.L. Acta Crystallogr.** v.56, p. 1385-1394, 2000.

RAMALHO, T. C.; FRANÇA, T. C. C.; RENNÓ, N. M.; GUIMARÃES, A. P.; CUNHA, E. F. F.; KUCA, K. Development of new acetylcholinesterase reactivators: Molecular modeling versus in vitro data **Chemico-Biological Interactions**., v. 185, p. 73-77, 2010.

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

WOREK, F.; THIERMANN, H.; SZINICZ, L.; EYER, P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. **Biochemical Pharmacology**. v.68, p. 2237-2248, 2004.