

ESTUDO COMPUTACIONAL DE REATIVADORES DA ACETILCOLINESTERASE INIBIDA PELO PESTICIDA AGRÍCOLA FENAMIFÓS

Tiago Cetto Pietralonga¹
Simone Queiroga Brito Gonçalves¹
Tanos Celmar Costa França²
Arlan da Silva Gonçalves³

Resumo: Neste trabalho, foram obtidas, através da técnica de ancoramento molecular, as melhores energias de interação receptor-ligante, além das interações entre cinco oximas conhecidas e a acetilcolinesterase (AChE) de camundongo, inibida pelo pesticida fenamifós. Resultados mostraram que a oxima mais eficiente, *in silico*, foi a melhor em comparação com dados experimentais da literatura, onde o pesticida usado foi o paraoxon, muito similar ao fenamifós.

Palavras-chave: pesticidas agrícolas; ancoramento molecular; oximas.

COMPUTATIONAL STUDY OF REACTIVATORS OF INHIBITED ACETYLCHOLINESTERASE BY THE AGRICULTURAL PESTICIDE FENAMIPHOS

Abstract: In this work were acquired by molecular docking technique the best receptor-ligand interaction's energy, in addition to the interactions among five known oximes and the mouse acetylcholinesterase (AChE) inhibited by fenamiphos pesticide. Results showed that the more efficient oxime, *in silico*, was the best in comparison with experimental data of literature, where the used pesticide was the paraoxon, very similar to fenamiphos.

Keywords: agricultural pesticides; molecular docking; oximes.

1 Instituto Federal do Espírito Santo, *campus* Guarapari.
2 Instituto Militar de Engenharia, Praça General Tibúrcio, Rio de Janeiro.
3 Instituto Federal do Espírito Santo, *campus* Vila Velha.

1 INTRODUÇÃO

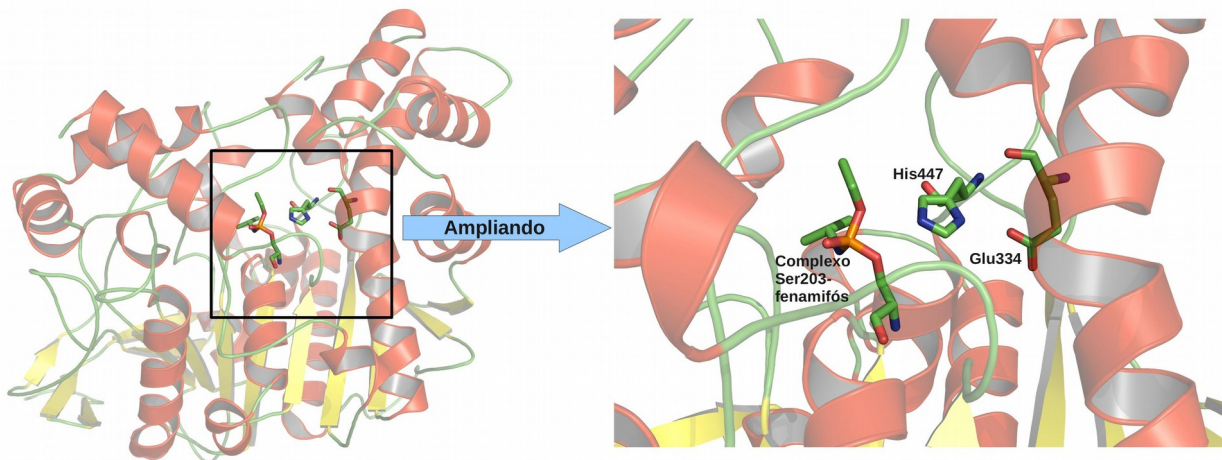
No meio agrícola, é muito comum o uso de substâncias químicas no controle de pragas e doenças de plantas, sejam elas provenientes de síntese ou de extração de compostos orgânicos. O desenvolvimento dessas substâncias foi impulsionado pela revolução verde, que objetivou atender o anseio do homem de elevar a produtividade agrícola e, conseqüentemente, melhorar sua condição de vida (Braibante *et al.*, 2012).

Existem mais de mil formulações diferentes de agrotóxicos, incluindo inseticidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, fumigantes e outros compostos orgânicos, além de substâncias usadas como reguladores de crescimento, desfolhantes e dissecantes (Braibante *et al.*, 2012), sendo que os piores para a saúde humana são os pertencentes à classe dos organofosforados (OP) neurotóxicos. Esses compostos atuam no sistema nervoso central (SNC), inativando a enzima acetilcolinesterase (AChE), que é responsável pelo controle da transmissão dos impulsos nervosos, através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), que interage especificamente com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré e pós-sinápticas (Fujii *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 1994).

Na presença de organofosforados neurotóxicos, como alguns pesticidas empregados no meio agrícola, a AChE é inibida e impedida de hidrolisar a ACh, fato que desencadeia a chamada síndrome colinérgica, caracterizada por convulsões, batimento cardíaco irregular, vômito e descontrole dos movimentos involuntários até uma parada cardiorrespiratória central seguida de morte. Essa inibição ocorre em uma região da enzima conhecida como garganta do sítio ativo, onde o pesticida se liga covalentemente ao aminoácido Ser203, que hidrolisa a ACh, impedindo-a de controlar a transmissão dos impulsos nervosos (Gonçalves *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2011). A Figura 1 mostra a estrutura tridimensional da AChE de camundongo, inibida pelo pesticida fenamifós, destacando os aminoácidos da tríade catalítica, Ser203, His447 e Glu334. Para preparar essa imagem, a estrutura tridimensional da enzima inibida foi baixada do servidor

Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) sob o código 2WU3, e visualizada e renderizada com o programa livre PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

Figura 1 - Estrutura tridimensional da AChE de camundongo, na representação *cartoon*, inibida pelo pesticida fenamifós e destacando, na representação varetas, os aminoácidos da tríade catalítica.



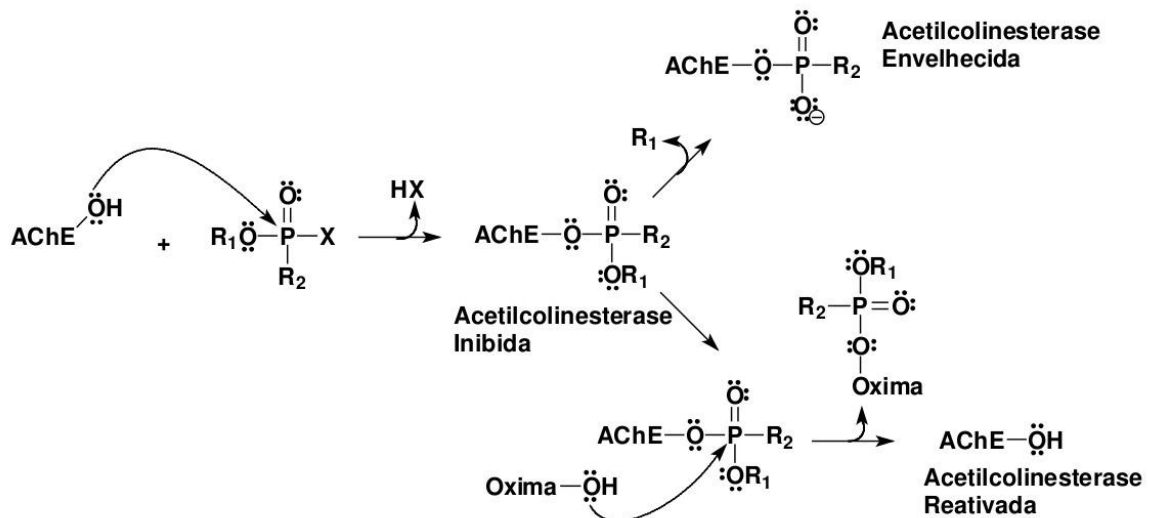
No Brasil, o fenamifós tem uso autorizado para aplicação foliar contra mudas de marantas e aplicação no solo, nas culturas de algodão, banana, batata, cacau, café, melão e tomate (Silva, 2010). Ainda é importante relatar que este pesticida, dependendo da dose empregada, é muito tóxico e pode levar o agricultor à morte, tendo em vista que o fenamifós pertence à classe I na classificação toxicológica e apresenta um índice de ingestão diária de 0,0008 mg/kg de peso corporal (ANVISA, 2003).

Os antídotos mais utilizados para a reativação da AChE são as oximas. Estes fármacos agem entrando na cavidade da enzima, também conhecida como poço do sítio ativo, se ligando covalentemente ao pesticida e retirando-o, caso a AChE não esteja na forma envelhecida, sendo esta uma forma impossível de se reativar, onde o pesticida está desalquilado. Os mecanismos de

inibição, reativação e envelhecimento da enzima são mostrados de forma mais detalhada na Figura 2.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi a identificação da oxima mais eficiente na desinibição da enzima AChE, inibida pelo fenamifós.

Figura 2 - Inibição, reativação e envelhecimento da AChE



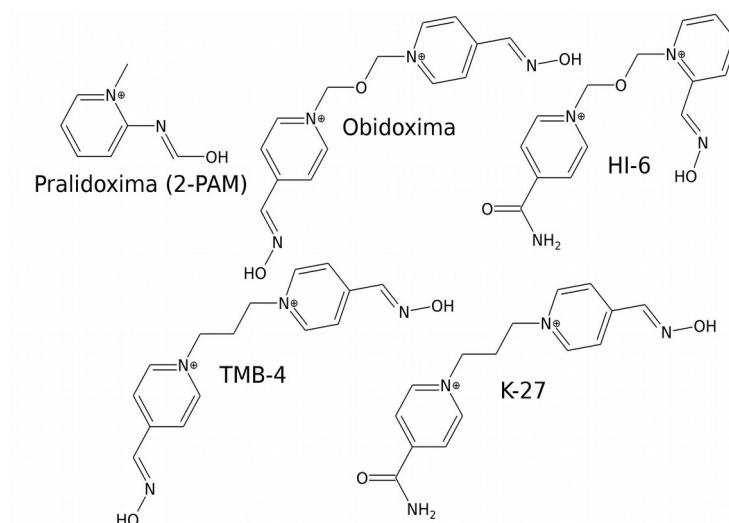
Fonte: Gonçalves *et al.* (2006).

2 METODOLOGIA

Desenho e otimização das oximas

No presente trabalho, foram feitos estudos, por ancoramento molecular, do comportamento de cinco oximas (conforme a Figura 3) no interior do sítio ativo da AChE de camundongo inibida pelo pesticida fenamifós, e o critério de escolha das melhores oximas foi a energia de ancoramento (quanto mais negativa, melhor), que será melhor explicada nesta seção.

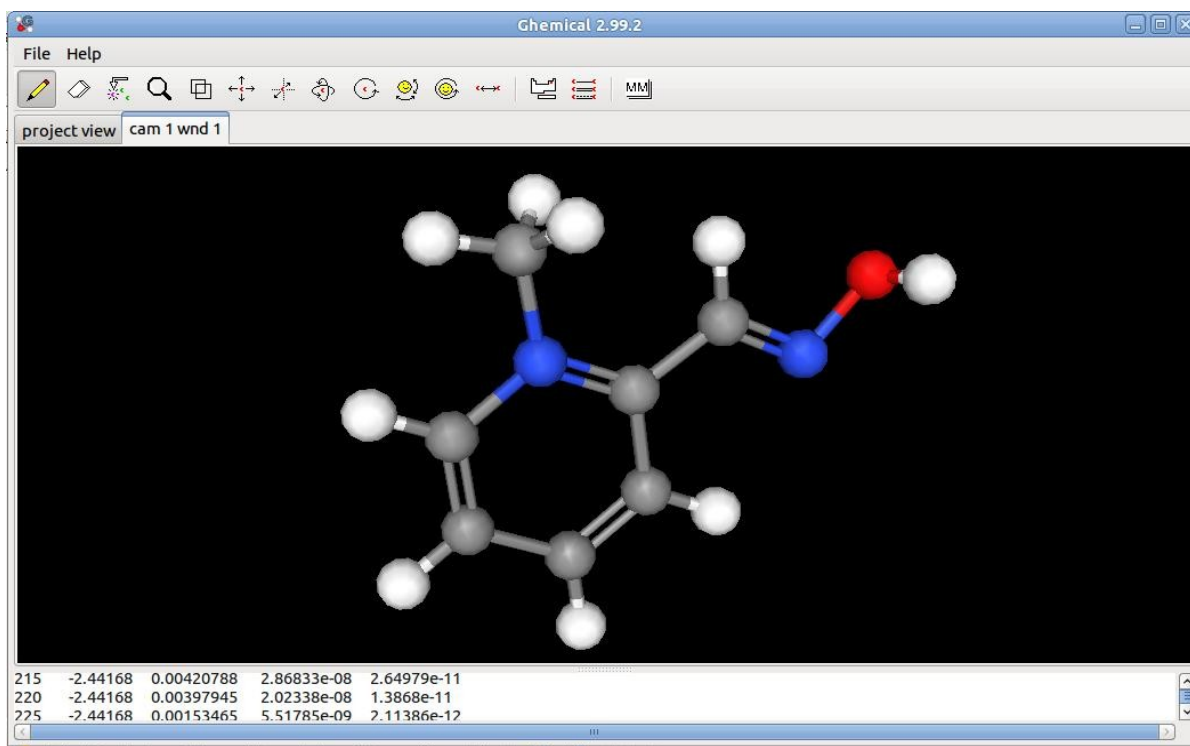
Figura 3 - Estruturas das cinco oximas estudadas neste trabalho



Fonte: Nurulain *et al.* (2009); Gonçalves *et al.* (2010).

O programa usado para desenhar e otimizar as oximas (colocá-las geometricamente estáveis, com os valores dos comprimentos das ligações e os ângulos entre os átomos próximos de valores experimentais), foi o GHEMICAL (Hassinen *et al.*, 2001), que é gratuito e simples de usar. A Figura 4 mostra a interface gráfica do programa GHEMICAL, com a pralidoxima (2-PAM) desenhada e já otimizada.

Figura 4 - Interface gráfica do programa GHEMICAL, com os átomos de hidrogênio mostrados em branco, os de carbono em cinza, os de oxigênio em vermelho e os de nitrogênio em azul.



No GHEMICAL, todas as oximas foram otimizadas usando mecânica molecular e o campo de forças TRIPOS 5.2 (Shih *et al.*, 1995), seguidas por otimizações semiempíricas, usando o método RM1 (Rocha *et al.*, 2006), com o programa MOPAC (Stewart, 2007). Já as cargas foram calculadas usando o programa ACPYPE (Silva *et al.*, 2012) e o método AM1-BCC (Jakalian *et al.*, 2000).

Após a otimização semiempírica das oximas, suas estruturas tridimensionais foram exportadas para o formato .mol2, que, além de conter informações sobre as coordenadas X,Y, Z de cada átomo, também contém os valores das cargas atômicas, ou seja, conjunto de informações

úteis para o posterior cálculo de ancoramento molecular.

Atracamento molecular

Docking ou ancoramento molecular é uma ferramenta importante para se prever a interação entre um receptor (que pode ser uma enzima ou proteína) e um pequeno ligante. O primeiro modelo do ancoramento molecular usado foi o modelo de chave-fechadura, onde o receptor era comparado a uma fechadura e o ligante que melhor se encaixava, a uma chave.

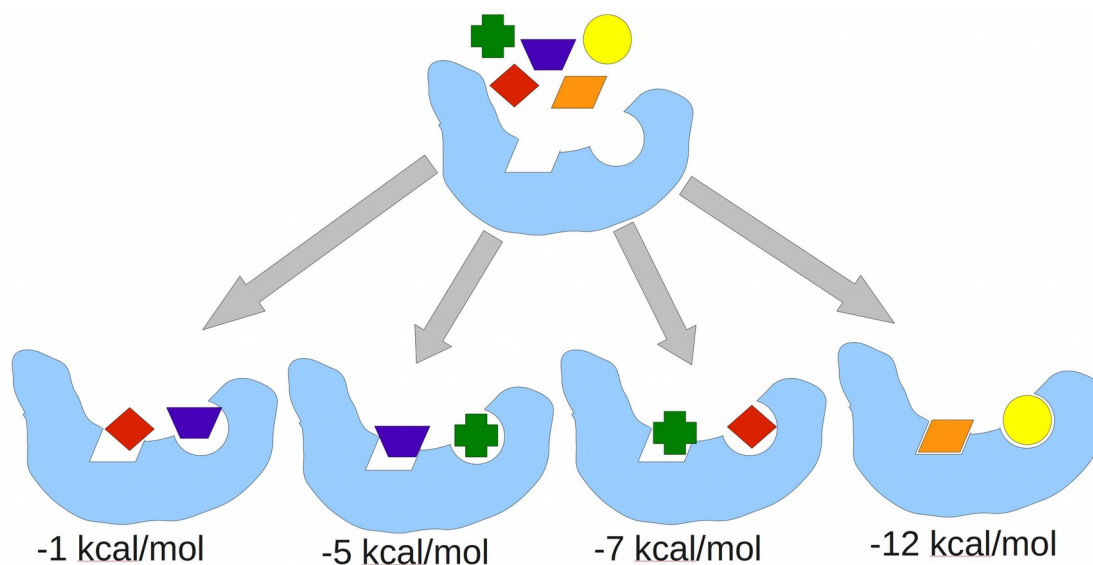
Atualmente, já se pode fazer *docking* considerando o ligante totalmente flexível ou até, além do ligante, alguns aminoácidos da enzima ou proteína flexíveis, tendo em vista que no meio biológico tanto o receptor como o ligante são flexíveis. Assim, com a evolução e a implementação de novos algoritmos nos programas de ancoramento molecular, foi possível prever o comportamento de um sistema biológico no computador.

Para se dizer se o ancoramento molecular está bom ou ruim, é usada a equação geral da energia,

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

O primeiro termo dessa equação (E_{inter}) se refere à energia de interação entre o receptor e o ligante e, além disso é baseado nas interações de *van der Waals* e eletrostáticas. Já o segundo (E_{intra}) está relacionado, principalmente, com os graus de liberdade dos ligantes. Deste modo, quanto menor a energia de *docking*, melhor será o ancoramento molecular. A Figura 5 ilustra de forma didática o modelo chave-fechadura, com suas respectivas energias. Nota-se que o melhor encaixe representa o melhor ancoramento com energia de -12 kcal/mol.

Figura 5 - Ilustração didática do modelo chave-fechadura, onde o sistema maior, em azul, representa o receptor, e as menores figuras geométricas representam os ligantes.



Mais detalhes sobre os fundamentos teóricos do *docking* ou ancoramento molecular podem ser vistos na página principal do programa AUTODOCK VINA (Troff *et al.*, 2010), <http://vina.scripps.edu/>, usado neste trabalho.

Após a etapa de desenho e otimização, as coordenadas tridimensionais das oximas e da AChE foram abertas com o programa AUTODOCK TOOLS (<http://mglttools.scripps.edu/>), interface gráfica e ferramenta facilitadora de ancoramentos do AUTODOCK VINA.

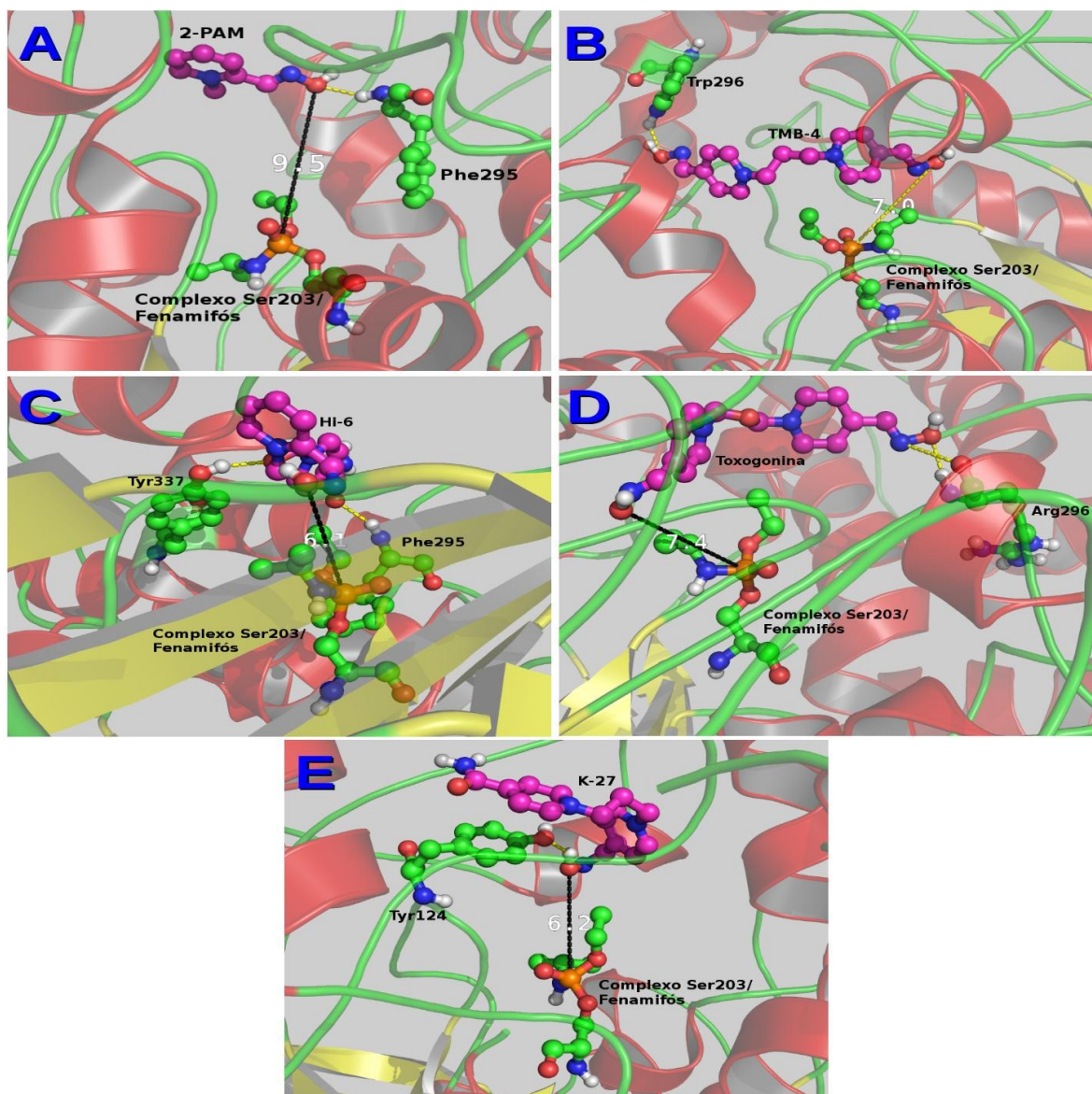
Após definidos os graus de liberdade (eixos de rotação) dos ligantes, o centro da enzima e uma região hexaédrica conhecida como *grid*, que engloba os principais resíduos do sítio ativo da AChE (Ser203, His447, Glu334 e outros), os *dockings* foram realizados usando o arquivo texto *conf.txt*, contendo os parâmetros escolhidos para todas as corridas, que foram, respectivamente: receptor = AChE-fenamifos.pdbqt center_x = 27.48; center_y = 15.31; center_z = 13.69; size_x = 31; size_y = 31; size_z = 31; cpu = 4; num_modes = 20.

Isso significa dizer que o termo *receptor* se refere a proteína ou enzima; *center_x*, *center_y* e *center_z*, se referem às coordenadas tridimensionais do centro do *grid* e *size_x*, *size_y* e *size_z*, ao tamanho do *grid*. Já *cpu = 4* significa dizer que o cálculo está rodando em paralelo, usando os quatro processadores do computador e, *num_modes=20*, significa dizer que os 20 melhores resultados dos ancoramentos, ou seja, as vinte melhores poses, serão extraídas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos cálculos de ancoramento molecular, foi mostrado que as oximas mais próximas do organofosforado fenamifós foram a K-27 e a HI-6, com as distâncias entre os oxigênios das oximas e o fósforo do organofosforado de, respectivamente, 6,2 e 6,1 Å. Já a oxima que ficou em uma posição menos favorável à desinibição da AChE foi a 2-PAM, com distância entre o oxigênio da oxima e o fósforo do fenamifós com o valor de 9,5 ângstrons. Os resultados de ancoramento para todas as oximas estudadas neste trabalho são apresentados na Figura 6.

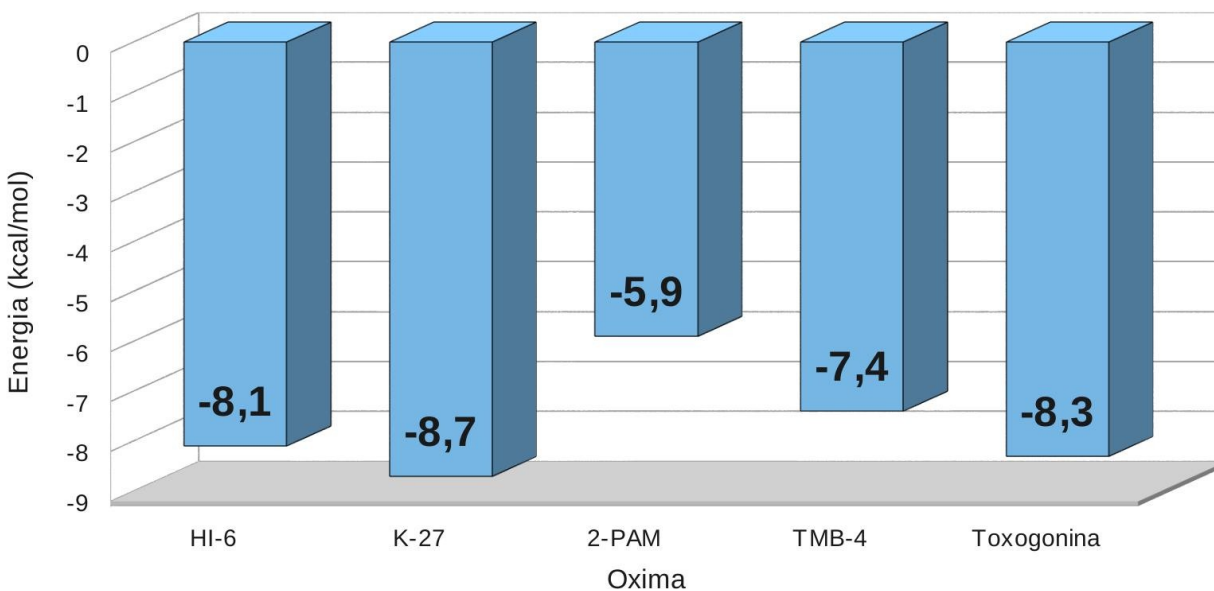
Figura 6 - Melhores poses dos ancoramentos moleculares para as oximas 2-PAM, TMB-4, HI-6, Toxogonina e K-27



Os cálculos das energias de ancoramento também mostraram que as melhores oximas foram a *K-27* e a *HI-6*, com os valores das energias de ligação de, respectivamente, $-8,7$ kcal/mol e $-8,1$ kcal/mol, como mostrado na Figura 7, correlacionando com os resultados das distâncias, anteriormente descritos.

Quanto menor a energia de *docking* ou energia de ligação, melhor será o resultado. Deste modo, nossos resultados sugerem ainda que a oxima que menos favoreceu o processo de reativação da enzima foi a *2-PAM*.

Figura 7 - Energias de ancoramento molecular para as oximas *2-PAM*, *TMB-4*, *HI-6*, Toxogonina e *K-27*.



Ao se compararem os resultados deste artigo com dados da literatura propostos por Nurulain e colaboradores (2009), resultados de *docking* puderam ser relacionados com resultados experimentais, nos quais três destas mesmas oximas foram testadas em camundongos expostos a

uma dose de 5 micro-molar de paraoxon, similar ao fenamifós, e submetidos a um tratamento com oximas, quantificando-se o percentual de mortalidade após 30 minutos de exposição ao organofosforado, que foi de 96%, 54% e 17%, quando tratados, respectivamente, pela 2-PAM, Toxogonina e K-27 (Nururain *et al.*, 2009). Deste modo, pôde-se observar que, ao se tratarem camundongos com a oxima K-27, houve um menor percentual de mortalidade e, conseqüentemente, uma menor energia de ancoramento molecular. Já quando tratados com a 2-PAM, houve um maior percentual de mortalidade, correlacionado com uma maior energia de *docking*. Isso significa dizer que, quanto menor a energia de *docking*, mais estável é a interação entre a oxima e o complexo enzima-organofosforado e, conseqüentemente, mais favorável é o processo de reativação enzimática.

É importante deixar claro que os testes em camundongos foram feitos *in vivo* e não na enzima AChE propriamente dita, não sendo necessário este ser realizado, tendo em vista que já está bem elucidado pela literatura que o alvo molecular de um organofosforado neurotóxico é a própria enzima acetilcolinesterase.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pelos programas de química computacional usados neste trabalho, aplicados no desenho, na otimização de estrutura e nos cálculos de ancoramento molecular, sugerem que a oxima K-27 será a mais indicada para futuro tratamento de agricultores intoxicados pelo pesticida agrícola fenamifós e, além disso, em comparação com dados da literatura, apesar de não ser o mesmo pesticida, houve uma boa correlação entre resultados *in silico* e experimentais, validando o protocolo utilizado no presente artigo, propondo-se sua aplicação em outros problemas biológicos similares, para que outros pesquisadores possam vir a testar estas mesmas oximas em camundongos intoxicados pelo fenamifós.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e ao IFES o apoio financeiro e o material utilizado para a realização deste trabalho, bem como aos revisores e editores da revista Ifes Ciência a enriquecedora contribuição técnico-científica.

6 REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Consulta Pública nº 50, de 09 de junho de 2003. D.O.U de 11/06/2003.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **QNEsc**. 34(1), 10, 2012.

FUJII, T.; TAKADA-TAKATORI, Y.; KAWASHIMA K. Basic and Clinical Aspects of Non-neuronal Acetylcholine: Expression of an Independent, Non-neuronal Cholinergic System in Lymphocytes and Its Clinical Significance in Immunotherapy. **J. Pharmacol Sci**. 106(2), 186, 2008.

GONÇALVES, A. S. et al. Molecular dynamics of the interaction of pralidoxime and deazapralidoxime with acetylcholinesterase inhibited by the neurotoxic agent tabun. **J. Braz. Chem. Soc**. 17, 968, 2006.

GONÇALVES, A. S. et al. Conformational Analysis of Toxogonine, TMB-4 and HI-6 using PM6 and RM1 methods. **J. Braz. Chem. Soc**. 21, 179, 2010.

GONÇALVES, A. S. et al. Molecular dynamics simulations and QM/MM studies of the reactivation by 2-PAM of tabun inhibited human acetylcholinesterase. **J. Braz. Chem. Soc**. 22, 155, 2011

HASSINEN, T.; PERÄKYLÄ, M. New energy terms for reduced protein models implemented in an off-lattice force field. **J. Comput Chem**. 22, 1229, 2001.

JAKALIAN, A. et al. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method. **J. Comput Chem**. 21, 132, 2000.

NURULAIN, S. M. et al. Efficacy of Eight Experimental Bispyridinium Oximes Against Paraoxon-Induced Mortality: Comparison with the Conventional Oximes Pralidoxime and Obidoxime. **Neurotox Res.** 16, 60, 2009.

ROCHA, G. B. et al. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **J. Comput Chem.** 27, 1101, 2006.

SHIH, J. H; CHEN, C. L. Molecular Dynamics Simulation of Bisphenol A Polycarbonate. **Macromolecules**, 28, 4509, 1995.

SILVA, A. W. S; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. **BMC Research Notes.** 5, 367, 2012.

SILVA, J. C. C. **Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Determinação de Microcistina-LR e Agrotóxicos em Águas Superficiais, utilizando as técnicas de Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa Acopladas a Espectrometria de Massas.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, 2010.

STEWART, J. J. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **J. Mol. Model.** 13, 1173, 2007.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. **Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects** (Philadelphia). 248, 1994.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J. Comput Chem.** 31, 455, 2010.