

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

PABLO ECHEVERRIA MACEDO

***Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO MODELO PARA TRIAGEM DE
COMPOSTOS REATIVADORES DE ACETILCOLINESTERASE**

**São Gabriel
2021**

PABLO ECHEVERRIA MACEDO

***Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO MODELO PARA TRIAGEM DE
COMPOSTOS REATIVADORES DE ACETILCOLINESTERASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Jeferson Luis Franco

**São Gabriel
2021**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

M141d

Macedo, Pablo Echeverria

Drosophila melanogaster COMO ORGANISMO MODELO PARA TRIAGEM DE COMPOSTOS REATIVADORES DE ACETILCOLINESTERASE / Pablo Echeverria Macedo.

98 p.

Tese (Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2021.

"Orientação: Jeferson Luis Franco".

1. Oximas. 2. In vivo. 3. In vitro. 4. In silico. I. Título.

PABLO ECHEVERRIA MACEDO

***Drosophila melanogaster* COMO ORGANISMO MODELO PARA TRIAGEM DE
COMPOSTOS REATIVADORES DE ACETILCOLINESTERASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação *Stricto sensu* em Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Biológicas.

Tese defendida e aprovada em: 29, setembro de 2021.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jeferson Luis Franco
Orientador
Unipampa

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Unipampa

Prof. Dra. Daiana Silva de Ávila
Unipampa

Prof. Dr. Marcelo Farina
UFSC

Dedico este trabalho ao meu pai Zilmar Pereira Macedo (*in memoriam*), que me ensinou, pelo exemplo, que não podemos desistir dos nossos sonhos.

AGRADECIMENTO

Ao longo de tantos anos de vida acadêmica, é a primeira vez que me proponho a ocupar esse espaço. São 12 anos de Unipampa, 12 anos de muitas pessoas importantes e especiais que passaram pela minha vida e contribuíram para minha formação.

Gostaria de agradecer, primeiramente, aos meus pais. Meu pai uma vez escreveu, direcionado a mim: “Papai mostrou sempre que não podemos ser dependentes, deixar que terceiros interfiram em nosso destino, caminhos sempre tem atalhos, precisamos ter coragem, fé e determinação, arrastar correntes não são uma opção e você, Giulianna e mamãe são meus heróis”. Guardei o texto pois foi muito importante para o momento que estávamos passando e faz eu lembrar do exemplo de dedicação, trabalho, alegria e simpatia que ele era em todos os momentos, mesmo quando a doença chegou e acabou o levando. A minha mãe gostaria de agradecer por todo suporte dado, por todo carinho e zelo direcionado a mim e a minha irmã.

Ao Professor Jeferson por aceitar me orientar quando eu cheguei no laboratório, no final do primeiro semestre de doutorado, com uma bagagem de graduação e mestrado completamente diferente da praticada no laboratório. Por ter paciência com minhas limitações, dando a oportunidade de que eu concluísse mais uma etapa da minha formação.

A Professora Thais e a todos os colegas do grupo de pesquisa, Giulianna (minha irmã querida), Mauro, Dennis, Illana, Karen, Luana, Nathane e Andressa por terem me recebido tão bem e auxiliarem na minha adaptação. Eu certamente fiz novos amigos que pretendo levar para a continuidade da minha caminhada.

A todos os professores que passaram pela minha formação, em especial aqueles que me orientaram na graduação, Professor Fabiano e no mestrado, Gabriel e Professor Paulo.

Aos colegas que tive na graduação, mestrado e doutorado, aos funcionários terceirizados que trabalham na universidade e ajudam para que ela funcione da melhor maneira possível.

Aos amigos Judeu, Fafá, Tadeu e Jeff por tantos anos de amizade e diversão jogando Diablo III nas noites de sexta e sábado.

A minha avó que recebeu a mim e a minha irmã em sua casa e permitiu que por lá morássemos por quase sete anos.

Ao meu bem, Milianne, por demonstrar tanto carinho por mim e por todos que com ela convivem.

Muito obrigado.

“Não importa o que aconteça, CONTINUE
A NADAR”.

Graham Walters

RESUMO

Dentre os agroquímicos mais utilizados para suprir o aumento na demanda por estratégias que possam conferir segurança à demanda de produção agrícola nacional está o composto organofosforado classificado como inseticida, clorpirifós. Intoxicações agudas causadas por esse composto acarretam na inibição da enzima acetilcolinesterase, evento que ocasiona no acúmulo do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica, assim como no consequente desenvolvimento de uma condição denominada de síndrome colinérgica. O tratamento direcionado para os quadros de intoxicação por esse composto baseiam-se na administração de reativadores da enzima, estruturas conhecidas como oximas. Sendo assim, o desenvolvimento deste trabalho consistiu em avaliar através de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo* a utilização do organismo modelo *Drosophila melanogaster* como plataforma para triagem dos reativadores da enzima acetilcolinesterase, pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6, metoxima, K027 e K048 frente a inibição induzida pelo organofosforado Clorpirifós. A abordagem *in silico* demonstrou por meio de ancoragem molecular que o clorpirifós possui acesso ao sítio Gorge da enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster*, assim como as energias de interação e possíveis conformações adotadas pelas oximas avaliadas nesta região. A abordagem *in vitro* demonstrou que as oximas pralidoxima e K048 apresentaram as maiores taxas de reativação da enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster*, 38,1% e 38,7%, respectivamente, seguidas das oximas trimedoxima com 28,3%, K027 com 17,6%, obidoxima com 17%, metoxima com 15,3% e HI-6 com 15,2%. As oximas avaliadas demonstraram discreta capacidade de ação antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH, não superando o ácido ascórbico. Não foi encontrada correlação entre o potencial de reativação da acetilcolinesterase pelas oximas e suas atividades antioxidantes. A abordagem *in vivo* demonstrou que os espécimes de *D. melanogaster* expostas ao clorpirifós e tratadas com as oximas pralidoxima e K048, apresentaram proteção em relação a taxa de sobrevivência, atividade locomotora e atividade da enzima acetilcolinesterase. Sendo assim, demonstramos o potencial uso de *Drosophila melanogaster* para triagem prévia de compostos reativadores da acetilcolinesterase, podendo esta ser uma importante ferramenta para a descoberta de novas oximas.

Palavras-Chave: Oximas, *Drosophila melanogaster*, *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, Clorpirifós.

ABSTRACT

Among the most used agrochemicals to supply the increased demand for application that can provide security to the demand for domestic agricultural production is the organophosphate compound classified as an insecticide, chlorpyrifos. Acute poisonings caused by this compound lead to inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, an event that causes the accumulation of the neurotransmitter acetylcholine in the synaptic cleft, as well as not the consequent development of a condition called a cholinergic syndrome. Treatment aimed at cases of intoxication by this compound is based on the administration of enzyme reactivators, structures such as oximes. Therefore, the development of this work consisted of evaluating, through *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* approaches, the use of the model organism *Drosophila melanogaster* as a platform for screening the reactivators of the enzyme acetylcholinesterase, pralidoxime, trimedoxime, obidoxime, HI-6, melanogaster, K027, and K048 against inhibition induced by the organophosphate chlorpyrifos. The *in silico* approach follows through molecular anchoring that chlorpyrifos has access to the Gorge site of the acetylcholinesterase enzyme from *D. melanogaster*, as well as the interaction energies and possible conformations adopted by the oximes evaluated in this region. The *in vitro* approach changed that the oximes pralidoxime and K048 had higher reactivation rates of the enzyme acetylcholinesterase from *D. melanogaster*, 38.1%, and 38.7%, respectively, followed by the oximes trimedoxime with 28.3%, K027 with 17.6%, obidoxime with 17%, methoxime with 15.3% and HI-6 with 15.2%. The oximes evaluated demonstrated a discrete capacity of antioxidant action by the ABTS and DPPH methods, not surpassing ascorbic acid. No correlation was found between the reactivation potential of acetylcholinesterase by oximes and their antioxidant activities. The *in vivo* approach includes *D. melanogaster* specimens exposed to chlorpyrifos and treated with pralidoxime and K048 oximes, protection concerning activity rate, locomotor activity, and acetylcholinesterase enzyme activity. Therefore, we demonstrate the potential use of *D. melanogaster* for prior screening of acetylcholinesterase reactivating compounds, which may be an important tool for the discovery of new oximes.

Keywords: Oximes, *Drosophila melanogaster*, *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, Chlorpyrifos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura geral de um composto organofosforado ...	21
Figura 2 – Estrutura química do organofosforado clorpirifós e do clorpirifós-oxon..	22
Figura 3 – Representação do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase.....	24
Figura 4 – Os principais mecanismos do sistema de defesa antioxidante.....	26
Figura 5 – O mecanismo molecular da reativação da AChE pela pralidoxima	29
Figura 6 – O organismo modelo <i>Drosophila melanogaster</i>	29
Figura 7 – Comparação das estruturas tridimensionais das AChEs.....	43
Figura 8 – Estrutura tridimensional da enzima AChE	44
Figura 9 – Clorpirifós e o sítio Gorge da AchE de <i>D. melanogaster</i>	46
Figura 10 – Estruturas químicas das oximas	47
Figura 11 – Sítio ativo da acetilcolinesterase de <i>D. melanogaster</i>	48
Figura 12 – Pralidoxima e o sítio Gorge da enzima AChE de <i>D. melanogaster</i>	53
Figura 13 – Trimedoxima e o sítio Gorge da enzima AChE de <i>D. melanogaster</i>	54
Figura 14 – Obidoxima e o sítio Gorge da enzima AChE <i>D. melanogaster</i>	55
Figura 15 – Metoxima e o sítio Gorge da enzima AChE <i>D. melanogaster</i>	56
Figura 16 – HI-6 e o sítio Gorge da enzima AChE <i>D. melanogaster</i>	57
Figura 17 – K027 com o sítio Gorge da enzima AChE <i>D. melanogaster</i>	58
Figura 18 – K048 com o sítio Gorge da enzima AChE <i>D. melanogaster</i>	59
Figura 19 – Determinação da Cl ₅₀ do organofosforado clorpirifós	62
Figura 20 – Potencial de reativação das oximas.....	63
Figura 21 – Clorpirifós e os padrões de sobrevivência, atividade da enzima AChE e atividade locomotora de <i>D. melanogaster</i>	76
Figura 22 – Clorpirifós e as oximas sobre a sobrevivência de <i>D. melanogaster</i>	78
Figura 23 – Clorpirifós e as oximas sobre a atividade locomotora e a atividade da enzima acetilcolinesterase de <i>D. melanogaster</i>	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resíduos constituintes do sítio Gorge.....	44
Tabela 2 – Melhores poses, energias e interações	52
Tabela 3 – Potencial de reativação das oximas	70
Tabela 4 – Atividade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico presente nas oximas pelo método DPPH	72
Tabela 5 – Atividade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico presente nas oximas pelo método ABTS.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Agrotóxicos no Brasil: da economia à saúde pública.....	19
2.2	Agrotóxicos organofosforados (OFs).....	20
2.3	Clorpirifós.....	21
2.4	Enzimas colinesterases (ChEs).....	23
2.4.1	Acetilcolinesterase.....	23
2.5	Espécies reativas e estresse oxidativo.....	25
2.6	Tratamento das intoxicações.....	27
2.7	O organismo modelo <i>Drosophila melanogaster</i>	30
2.8	Biologia Estrutural.....	31
3	OBJETIVOS.....	33
4	METODOLOGIA.....	34
4.1	Abordagem <i>in silico</i>	34
4.1.1	Resgate e construção das estruturas	34
4.1.2	Ancoragem Molecular	34
4.2	Abordagem <i>in vitro</i>	36
4.2.1	Organismo Modelo	36
4.2.2	Preparo das amostras	36
4.2.3	Determinação Cl ₅₀	36
4.2.4	Efeito das oximas sobre a atividade enzimática <i>in vitro</i>	36
4.2.5	Determinação da atividade antioxidante das oximas <i>in vitro</i>	37
4.2.5.1	Atividade antioxidante das oximas pelo método DPPH	37
4.2.5.2	Atividade antioxidante das oximas pelo método ABTS	38
4.2.6	Análise Estatística	38
4.3	Abordagem <i>in vivo</i>	39
4.3.1	Organismo Modelo	39
4.3.2	Determinação CL ₅₀	39
4.3.3	Sobrevivência, atividade locomotora e efeito das oximas	39
4.3.4	Efeito das oximas sobre a atividade enzimática <i>in vivo</i>	40
4.3.5	Análises Estatísticas	40
5	APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	42
5.1	Abordagem <i>in silico</i>	42

5.1.1	A enzima AChE de <i>D. melanogaster</i>	42
5.1.2	Ensaio de ancoragem molecular	49
5.2	Abordagem <i>in vitro</i>	61
5.2.1	Efeito das oximas sobre a atividade da enzima AChE <i>in vitro</i>	61
5.2.2	Atividade antioxidante das oximas <i>in vitro</i>	70
5.3	Abordagem <i>in vivo</i>	74
5.3.1	Efeito das oximas sobre a atividade da enzima AChE <i>in vivo</i>	74
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

Os compostos organofosforados são amplamente utilizados pelo homem, sendo empregados com o intuito de aumento na produção agrícola através da interrupção no ciclo de vida de diversas espécies consideradas como pragas. Entre os compostos organofosforados empregados, encontra-se o clorpirifós. O clorpirifós possui duas formas principais de toxicidade, a inibição da enzima acetilcolinesterase e a produção de espécies reativas de oxigênio, podendo tanto espécies alvo como não alvo serem acometidas. O uso indiscriminado na utilização dessa classe de compostos acarreta em muitos casos de intoxicação, gerando importante problema de saúde pública. O tratamento nesses quadros geralmente se dá pela administração de atropina, antagonista competitivo dos receptores muscarínicos do neurotransmissor acetilcolina e pela administração de compostos da classe das oximas, que agem por sua vez como reativadores da enzima acetilcolinesterase. As oximas conhecidas e utilizadas na clínica não são completamente eficientes no processo de reativação da acetilcolinesterase, sendo sua efetividade dependente do agente inibidor complexado com a enzima e o tempo de sua conformação. Essa particularidade apresentada leva a necessidade da síntese e teste de novas estruturas com diferentes potenciais de reativação, assim como a validação de diferentes métodos para triagem de novas oximas, visando o desenvolvimento de compostos mais eficazes. Com base nisso, esse trabalho possui como objetivo geral à avaliação através de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo* do organismo modelo *Drosophila melanogaster* como plataforma alternativa para triagem de reativadores da enzima acetilcolinesterase. Como objetivos específicos *in silico*, o resgate e construção das estruturas que possibilitem propor um modelo de ligação entre as diferentes oximas avaliadas, pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6, metoxima, K027 e K048 com a acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster*. Como objetivos específicos *in vitro*, a avaliação do potencial efeito inibitório do clorpirifós sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster* e do potencial das oximas avaliadas em reverter essa inibição, assim como a avaliação da capacidade antioxidante das oximas avaliadas. Como objetivos específicos *in vivo*, a avaliação da capacidade protetora das oximas em *Drosophila melanogaster* expostas ao clorpirifós e a proposta da empregabilidade do organismo modelo *Drosophila melanogaster* como uma alternativa para triagem de novos compostos

reativadores. Para isso, vale-se do emprego de ferramentas de alinhamento e ancoragem molecular, assim como estudos comportamentais e bioquímicos para determinação e adequação de *Drosophila melanogaster* como um organismo alternativo para triagem de reativadores de acetilcolinesterase. Para esse fim, o trabalho é constituído por uma revisão centrada nos termos gerais atinentes à problemática relacionada às más práticas na utilização de agroquímicos, os mecanismos de toxicidade decorrentes destes e seus alvos moleculares, os tratamentos disponíveis para os casos de intoxicação, o organismo alternativo proposto para triagem de reativadores e as abordagens empregadas para essa investigação, os objetivos que delineiam o método empregado, os resultados gerados e a conclusão advinda destes.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agrotóxicos no Brasil: da economia à saúde pública

A produção agrícola é de suma importância para a solidez econômica do Brasil, conformando cerca de 26,6% do Produto Interno Bruto (PIB) do país no ano de 2020 (PIB DO AGRONEGÓCIO ALCANÇA PARTICIPAÇÃO DE 26,6% NO PIB BRASILEIRO EM 2020). Atualmente o Brasil conta com uma área cultivada em torno de 68 milhões de hectares, cerca de 7,9% de seu território, estes responsáveis por uma estimativa de safra para 2021 de cerca de 262,8 milhões de toneladas (EM MAIO, IBGE PREVÊ SAFRA DE 262,8 MILHÕES DE TONELADAS PARA 2021).

Concomitante ao cenário de crescimento do agronegócio nacional, está o aumento na demanda por agrotóxicos, substâncias químicas que conferem proteção à crescente área de cultivo nacional, onde no ano de 2017 atingiu cerca de 540 mil toneladas utilizadas, número 50% maior do que o empregado no ano de 2010 (VALADARES; ALVES; GALIZA, 2017).

Dentre os diversos fatores que levam à utilização em larga escala de produtos agroquímicos no Brasil, estão as peculiaridades encontradas em um país de clima tropical, característica que confere menor frequência de temperaturas amenas, importante influência na interrupção do ciclo de diversas pragas, aumento na produção agrícola e expansão da monocultura, sistema que propicia o surgimento de pragas e doenças (VASCONCELOS, 2018).

Entretanto, apesar da utilização de agroquímicos refletir no aumento da efetividade de produção, acarreta em possíveis prejuízos tanto ao meio ambiente, pela contaminação de solos e ambientes aquáticos através de processos de lixiviação, quanto para a saúde da população, principalmente dos trabalhadores envolvidos com o manejo dessas substâncias e das comunidades rurais existentes nas proximidades das plantações (VASCONCELOS, 2018).

No Brasil, 84.206 pessoas sofreram intoxicação por agrotóxicos entre 2007 e 2015, contudo, sabe-se que muitos casos existentes não são notificados (RELATÓRIO NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DE POPULAÇÕES EXPOSTAS A AGROTÓXICOS, 2018). Além desses, 2.548 casos foram registrados no ano de 2017, onde 2 devidos à ingestão de alimentos contaminados e 861 por

tentativas de suicídio (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS, 2017).

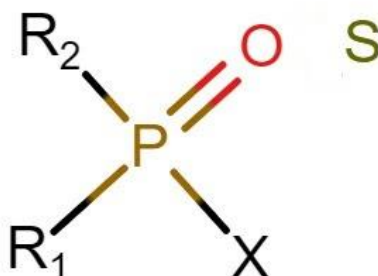
2.2 Agrotóxicos organofosforados (OFs)

Dentre os agrotóxicos mais utilizados na agricultura estão os compostos químicos pertencentes ao grupo dos organofosforados (OFs), normalmente anídeos, ésteres ou ésteres de tiol derivados do ácido fosfórico ou tiofosfórico (KANEKAR et al., 2004).

O desenvolvimento desses compostos como agrotóxicos teve início quando Gerhard Schrader, químico alemão, elucidou a estrutura química dos compostos OFs, trabalho esse que resultou no primeiro composto do tipo a ser comercializado como praguicida, batizado como Bladan. Desde então, centenas de compostos organofosforados foram desenvolvidos, sendo amplamente empregados na conformação de inseticidas, entre outros (TERRY, 2012).

De modo geral, a estrutura química dos OFs é demonstrada na Figura 1. Quando os radicais R1 e R2 estão ligados diretamente ao átomo de fósforo, recebe-se o nome de fosfinato. Quando os radicais R1 e R2 possuem ligação ao átomo de fósforo através de uma ligação via O- ou S-, recebe-se o nome de fosfato. Quando o radical R1 está ligado diretamente ao átomo de fósforo e R2 através de um dos grupos citados acima, recebe-se o nome de fosfonato. Quando o carbono está ligado ao átomo de fósforo através de grupamento amino (-NH), recebe-se o nome de fosforamidato. Em relação ao grupamento X, este pode ser de três tipos: um grupamento alifático, ramificado ou não, um grupamento aromático, ou um grupamento heterocíclico, onde a ligação ao fósforo pode se dar através de O- ou S-substituições. Além disso, a ligação dupla apresentada com o fósforo pode ser dar de dois modos distintos: o modo conhecido como forma oxon, caracterizado pela presença de fosfatos (P=O), e o modo conhecido como forma tion, caracterizado pela presença de fosforotiotatos (P=S) (VALE, 1998; JOHNSON et al., 2000).

Figura 1 – **Representação da estrutura geral de um composto organofosforado.** R1 e R2 representam grupos alcoxil. X representa o grupo substituível. O fósforo pode estar ligado através de uma dupla ligação com o oxigênio ou enxofre.



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Os nuances apresentados na estrutura química de diferentes compostos OFs influenciam diretamente na sua toxicidade. A natureza dos radicais ligados ao átomo de fósforo, com mais ou menos ramificações, assim como a presença do oxigênio (forma oxon) ou do enxofre (forma tion) na conformação da dupla ligação com o fósforo, acarretam em uma maior ou menor reatividade desses compostos. A toxicidade pode ainda ser influenciada pela lipofilicidade da molécula, característica que os torna mais ou menos aptos a atravessarem a barreira hematoencefálica (BHE), aumentando sua potencialidade sobre o sistema nervoso central (CAVALCANTI et al., 2016).

2.3 Clorpirifós

Dentre os OFs mais utilizados no Brasil, destaca-se o clorpirifós (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate), demonstrado na Figura 2, também comercializado com diferentes nomes, como Lorsban 480BR®, Dursban® e Fersol 450®. O desenvolvimento desse composto teve início no ano de 1965, nos Estados Unidos, sendo atualmente empregado em grande escala em diferentes culturas (EATON et al., 2008).

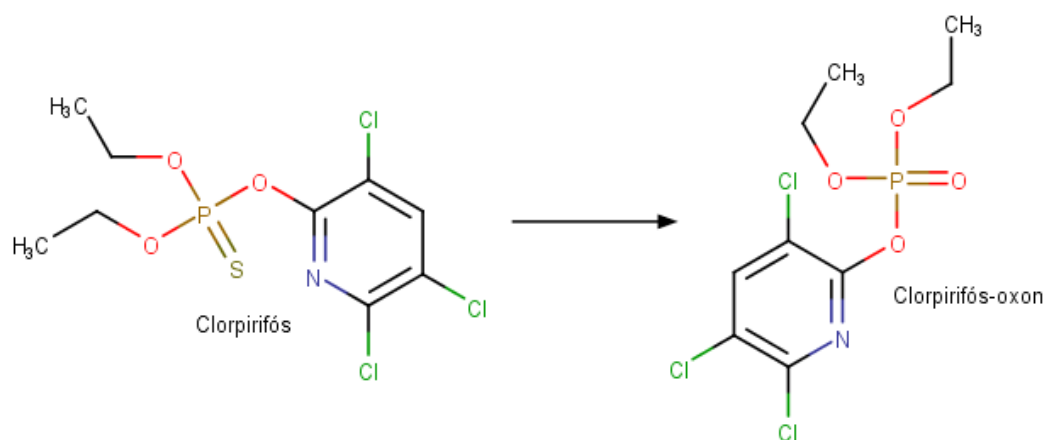
O clorpirifós apresenta aspecto cristalino, com pouca solubilidade em água, alto grau de volatilidade (1.9×10^{-5} mmHg/25°C) e meia vida que varia de 60 até 120 dias no solo (DA SILVA, 2013). Sua toxicidade é inicialmente demonstrada pela alta lipossolubilidade que possui, podendo ser absorvido por via respiratória ou pela pele

e mucosas. A absorção através do trato gastrointestinal é menos frequente, estando associada principalmente a ingestões acidentais, como a ingestão de alimentos contaminados, mais frequentemente alimentos não gerenciados de forma apropriada, assim como tentativas de suicídio (KI et al., 2013).

Independente da via de exposição ao clorpirifós, sua toxicidade depende da ação de enzimas do grupo citocromo P450, localizadas principalmente no fígado. Esse processo, caracterizado como dessulfuração oxidativa, oxida o clorpirifós para a forma clorpirifós-oxon, demonstrado na Figura 2, seu principal metabólito tóxico (ESTEVAN; VILANOVA; SOGORB, 2013).

Após esse processo de biotransformação, o clorpirifós possui dois principais mecanismos de toxicidade: o primeiro se baseia na inibição de enzimas da classe das colinesterases, evento que, entre outras, impede a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, promovendo desordem no sistema nervoso central e junções musculares, acarretando na interferência do correto funcionamento fisiológico (RAHMAN et al., 2021), o segundo se baseia na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a consequente depleção de defesas e enzimas antioxidantes, quadro que pode acarretar na indução de estresse oxidativo (GOEL; DANI; DHAWAN, 2005; ĆUPIĆ MILADINOVIĆ; BOROZAN; IVANOVIĆ, 2018; RODRIGUES et al., 2019; ZHU et al., 2020; FARHAN et al., 2021).

Figura 2 – **Estrutura química do organofosforado clorpirifós e do clorpirifós-oxon.** Estrutura química do organofosforado clorpirifós e do clorpirifós oxon, sua forma biotransformada.



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

2.4 Enzimas colinesterases (ChEs)

Atualmente são aceitos dois diferentes tipos de colinesterases: a butirilcolinesterase, também conhecida como pseudocolinesterase, ou colinesterase inespecífica (BChE) (EC 3.1.1.8), possui como característica o processo de hidrólise da butirilcolina, estando também relacionada com processos de detoxificação e bioativação de compostos xenobióticos, é encontrada principalmente no plasma e intestino, entretanto, em pequenas quantidades. A outra, conhecida como acetilcolinesterase verdadeira, ou acetilcolinesterase específica (AChE) (EC 3.1.1.7), possui como característica o processo de hidrólise da acetilcolina, atuando conseqüentemente na modulação dos impulsos nervosos responsáveis pela comunicação neuronal, é encontrada principalmente nas terminações nervosas e hemácias (KUSHIK; CHANDRABHAN, 2003; COSTA, 2006).

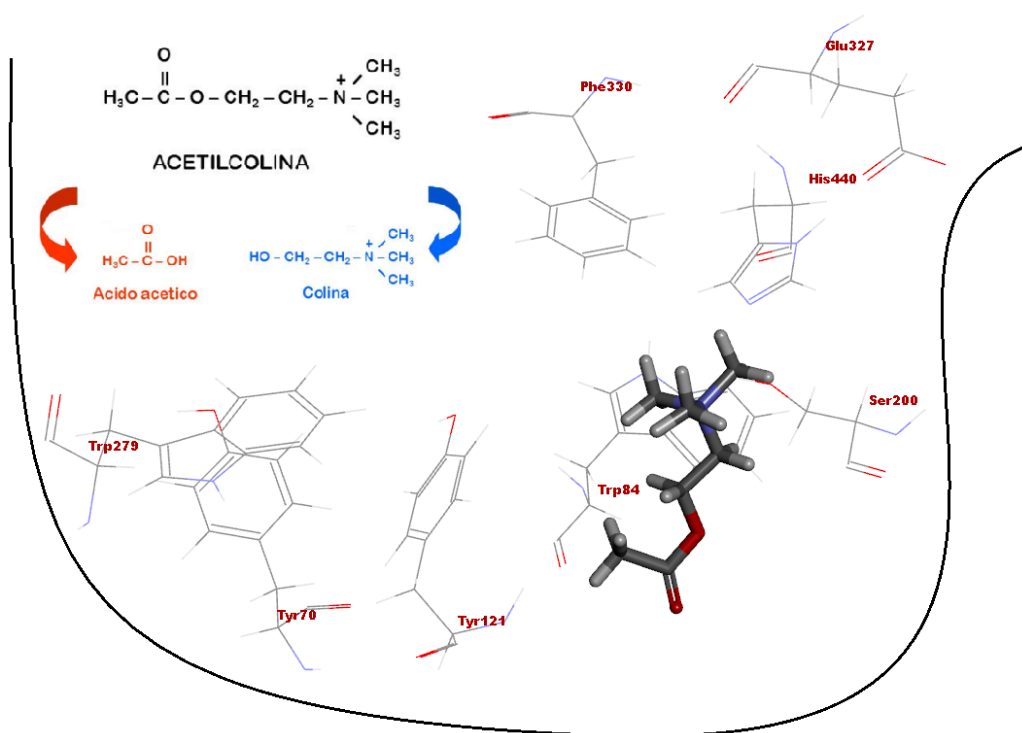
2.4.1 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase possui como função no organismo atuar na hidrólise do principal neurotransmissor existente no sistema nervoso da maioria das espécies, a acetilcolina. Entre os papéis desenvolvidos pela acetilcolina, está, no sistema nervoso central, sua atuação em processos de aprendizagem, memória e controle motor, assim como intermediar os impulsos nervosos responsáveis pelos batimentos cardíacos e contração dos músculos lisos no sistema nervoso periférico (SARTER; BRUNO, 1997).

Estruturalmente, a acetilcolinesterase de organismos vertebrados possui como uma de suas características a existência de uma cavidade denominada de sítio Gorge. O sítio Gorge apresenta muitos resíduos de aminoácidos, entretanto, as regiões mais importantes são a existência de dois subsítios ativos: o subsítio esterásico, conformado por uma série de resíduos aromáticos e em especial por uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácido glutamato 327, serina 200 e histidina 440 (SUSSMAN et al., 1991), e pelo subsítio aniônico, conformado pelos resíduos de aminoácido triptofano 84 e fenilalanina 330, além de acomodar os resíduos de aminoácido tirosina 70, tirosina 121 e triptofano 279, constituintes de um compartimento localizado no subsítio aniônico, denominado subsítio aniônico periférico (PAS) (SILMAN; SUSSMAN, 2008).

De modo geral, a enzima acetilcolinesterase presente na junção neuromuscular hidrolisa a acetilcolina liberada pela célula pós-sináptica por intermédio de ligações iônicas e de hidrogênio estabelecidas pelo resíduo de glutamato presente no subsítio esterásico, sendo os resíduos de serina e histidina responsáveis pelo mecanismo de hidrólise propriamente dito. No subsítio aniônico, ocorre a interação dos resíduos de tirosina e triptofano com o compartimento quaternário carregado positivamente da acetilcolina, o que acarreta na correta orientação do neurotransmissor nos subsítios (sítio Gorge). O subsítio aniônico periférico por sua vez, funciona provavelmente como um inibidor da acetilcolinesterase quando da ocorrência de excesso de disponibilidade de acetilcolina no meio. Esse evento interrompe o processo de interação da acetilcolina com o receptor pós-sináptico, gerando como produto da catálise, colina e ácido acético, evitando assim o excesso de transmissão nervosa (Figura 3) (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987).

Figura 3 – Representação do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase. Representação dos resíduos de aminoácidos envolvidos com o processo de catálise do neurotransmissor acetilcolina. A enzima acetilcolinesterase se liga ao neurotransmissor acetilcolina catalisando sua hidrólise em ácido acético e colina. A colina é reabsorvida pelos neurônios e reutilizada em um novo impulso nervoso.



Fonte: Adaptado de PETRONILHO; PINTO; VILLAR, 2011.

A inibição do funcionamento da acetilcolinesterase pela ação de compostos organofosforados, como o clorpirifós, ocorre através da fosforilação do resíduo de serina presente no sítio esterásico da enzima, evento que ocasiona interferência no mecanismo catalítico, impedimento de hidrólise da acetilcolina e seu consequente aumento na fenda sináptica. Os efeitos adversos advindos desse evento ocasionam em uma série de desordens no sistema nervoso central e periférico, como paralisia muscular, distúrbios gastrointestinais, incontinência urinária e fecal, aumento da salivação e lacrimejamento (RAHMAN et al., 2021).

2.5 Espécies reativas e estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados em sua última camada de valência, característica que as torna altamente reativas, tendo a capacidade de atuarem como agentes oxidantes. Dois são os tipos de agentes oxidantes mais importantes envolvidos em patologias: as espécies reativas de nitrogênio (ERN), compostas principalmente pelo óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), o óxido nitroso (N_2O) e o peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$) e as espécies reativas de oxigênio (ERO), onde destacam-se o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$) (GILLHAM; PAPACHRISTODOULOU; THOMAS, 1997).

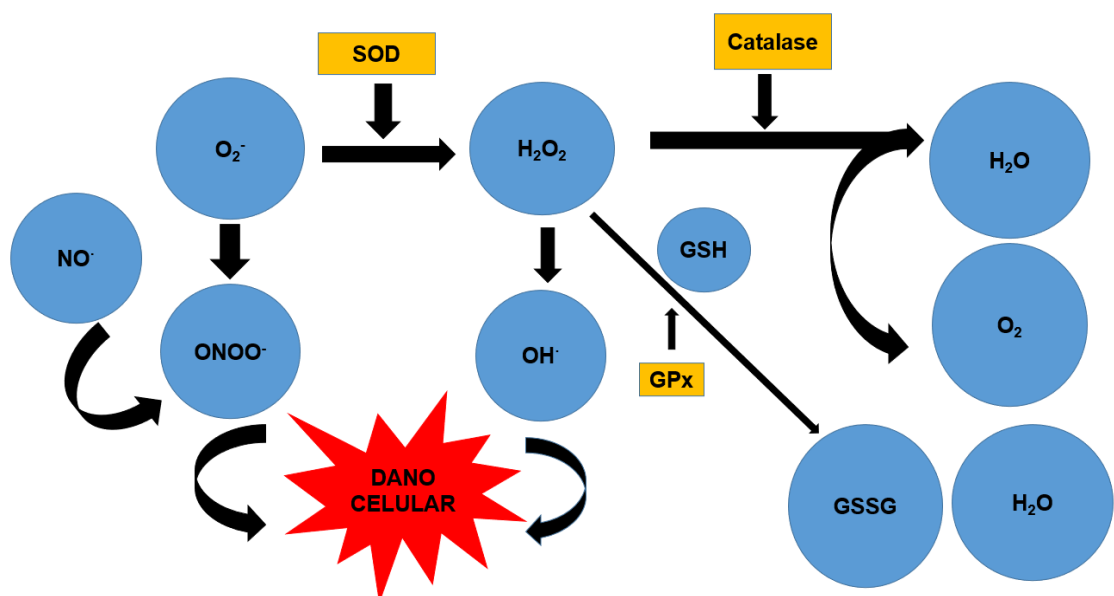
As espécies reativas de oxigênio possuem diversos papéis no organismo, passando de atuações na sinalização intracelular, regulação de respostas imunológicas e participações de processos fagocíticos quando em condições de homeostase (HALLIWELL, 1994; BIESALSKI, 2002), até lesões em diferentes estruturas celulares, como indução de peroxidação lipídica dos fosfolipídios constituintes da membrana celular e oxidação de proteínas quando em condições de desequilíbrio (ALLEN, 1998; ANANTHAN et al., 2003). Como mecanismo adaptativo para com os efeitos deletérios advindos do desequilíbrio nos níveis de agentes oxidantes (ERO e ERN), organismos aeróbicos possuem um sistema de defesa denominado como sistema de defesa antioxidante, estruturas doadoras de elétrons capazes de causar a estabilização dos diferentes radicais livres, podendo estes serem classificados como sistemas de defesa antioxidante endógenos ou exógenos.

Vários são os mecanismos pertencentes ao sistema de defesa antioxidante endógeno, alguns atuando antes da existência de lesões advindas da ação de agentes pró-oxidantes, assim como outros direcionados ao reparo de lesões já

ocorridas. Os diferentes mecanismos podem ser baseados em sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Entre os mecanismos de defesa enzimáticos encontram-se enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT), assim como o tripeptídeo glutathione reduzida (GSH), pertencente aos sistemas não enzimáticos (BIRBEN et al., 2012).

A enzima superóxido dismutase (SOD) possui como função, quando na presença do próton H^+ , de catalisar a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 (ACHARYA et al., 1991). A enzima catalase (CAT), de catalisar a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 (ROJKIND et al., 2002; KLICHKO, RADYUK, ORR, 2004). A enzima glutathione peroxidase (GPx), de catalisar a redução do H_2O_2 por intermédio da glutathione reduzida (GSH), em H_2O e glutathione oxidada (GSSG) (POSSAMAI, 2005). A enzima glutathione S-transferase (GST) por sua vez tem como função, por meio de ligações covalentes, impedir que diferentes compostos causadores de danos oxidativos se liguem a outras moléculas celulares, assim como aumentar a sua solubilidade e facilitar processos de detoxificação (STEGEMAN et al., 1992). Esses mecanismos são resumidos na figura 4 para melhor compreensão.

Figura 4 – **Os principais mecanismos do sistema de defesa antioxidante.** Representação esquemática do funcionamento dos principais mecanismos pertencentes ao sistema de defesa antioxidante.



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Dentre os mecanismos de defesa não enzimáticos, existem ainda, além da (GSH), substâncias provenientes de alimentação que, mesmo em baixas concentrações atuam em conjunto com as defesas antioxidantes endógenas, interagindo com espécies reativas (ERO e ERN) e íons, reduzindo-as, sendo estas denominadas como sistema de defesa antioxidante exógeno. Vários são os antioxidantes não enzimáticos exógenos, destacando-se os compostos fenólicos, carotenóides, vitaminas C e E e diferentes minerais que podem atuar como cofatores para o correto funcionamento do sistema de defesa enzimático (MENDES; CORRÊA; ANGELIS-PEREIRA, 2020).

Comprometimentos no sistema de defesa antioxidante podem estabelecer um desequilíbrio entre estes e os agentes pró-oxidantes, podendo acarretar em um quadro denominado estresse oxidativo, que pode por sua vez, estar associado a vários processos patológicos (GOEL; DANI; DHAWAN, 2005).

O estresse oxidativo tem demonstrado importante papel na toxicidade do clorpirifós em diferentes modelos *in vitro*, atuando principalmente na indução do aumento de espécies reativas de oxigênio, evento que pode ocasionar em peroxidação lipídica e dano ao DNA (GIORDANO et al., 2007; SAULSBURY et al., 2009; LEE et al., 2012; KI et al., 2013; LEE et al., 2014). A natureza lipofílica desse composto facilita ainda mais o processo de interação com as membranas celulares, principalmente com o alto nível de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas neuronais, assim como o elevado consumo de oxigênio e os baixos níveis de defesas antioxidantes encontradas no SNC (SLOTKIN; OLIVER; SEIDLER, 2005).

2.6 Tratamento das intoxicações

O tratamento das intoxicações por compostos organofosforados em geral é conduzido através da administração de agentes antimuscarínicos e compostos da classe das oximas. Dentre os agentes antimuscarínicos destaca-se a utilização da atropina, alcaloide que age como antagonista competitivo dos receptores muscarínicos do neurotransmissor acetilcolina, competindo com este pelo mesmo sítio de ligação (IYER; IKEN; LEON, 2015). O emprego dessa estratégia auxilia na amenização da hiper estimulação causada pelo acúmulo do neurotransmissor,

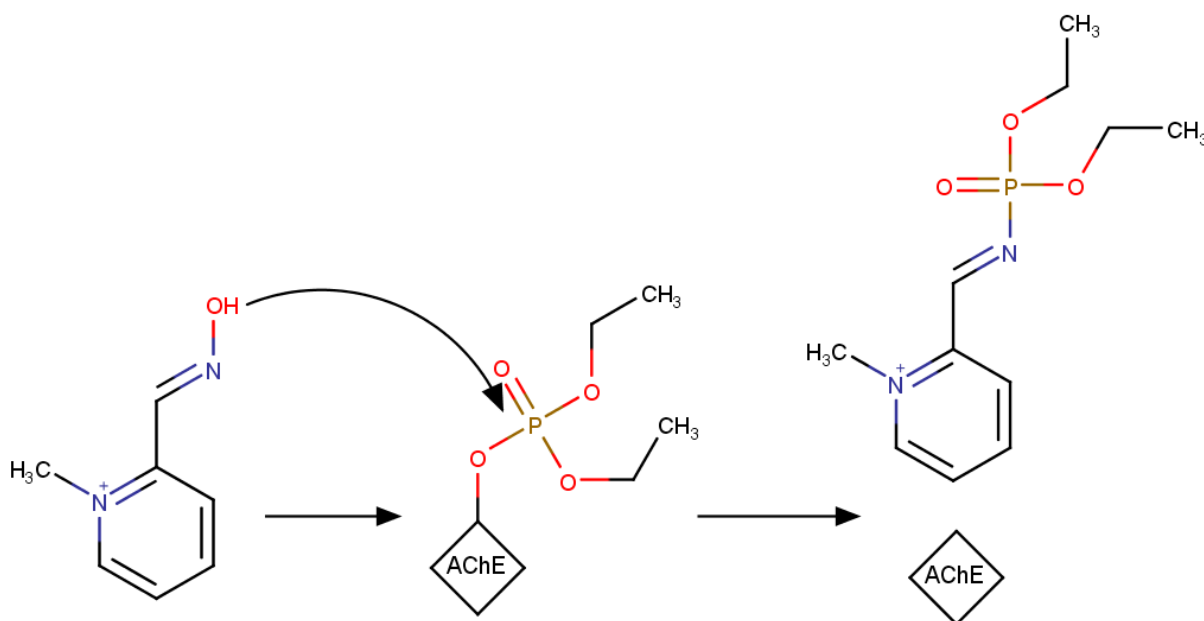
diminuindo sintomas como paralisia muscular, distúrbios gastrointestinais, incontinência urinária e fecal, aumento da salivação e lacrimejamento.

Os compostos da classe das oximas, por sua vez, agem como reativadores da enzima AChE, evento que ocasiona na reativação da atividade catalítica da enzima. Estruturalmente as oximas são caracterizadas pela presença de um nitrogênio quaternário pertencente a um anel piridínico, este se liga ao sítio aniônico da enzima, doando um próton H⁺ ao organofosforado acoplado ao sítio esterásico vizinho, mobilizando-o e liberando a enzima para sua atividade catalítica, possibilitando assim a diminuição da oferta de acetilcolina e a conseqüente diminuição dos sintomas adversos (GONÇALVES et al., 2006). Esse processo é representado na figura 5 para melhor visualização.

A efetividade da classe das oximas está relacionada com o período de tempo após a intoxicação em que são administradas. Curtos períodos do organofosforado acoplado ao sítio esterásico possibilitam melhores taxas de reativação. Longos períodos do organofosforado acoplado ao sítio esterásico acarretam no envelhecimento do complexo. O envelhecimento é caracterizado pela formação de uma ligação covalente entre o fósforo do organofosforado e o oxigênio da serina presente no sítio esterásico, evento que impossibilita a mobilização e liberação da enzima pela ação da oxima (ELHANANY *et al.*, 2001). O envelhecimento pode ser influenciado pela afinidade apresentada entre as estruturas das oximas e organofosforados, apresentando efetividade ou limitações no processo de reativação. Esse contraste pode ser visto entre a maioria dos organofosforados que são considerados de reativação mais fácil, como o gás Sarin, com uma meia vida para envelhecimento do complexo de cerca de 3 horas e o gás Soman, possuidor de envelhecimento extremamente rápido, cerca de 3 minutos, sendo considerado de difícil reativação (CAVALCANTI et al., 2016; WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016).

Essa diversidade apresentada no padrão de envelhecimento entre os complexos leva a grandes esforços para síntese e avaliação de novas oximas em busca de um reativador mais eficiente e universal para a acetilcolinesterase inibida por diferentes organofosforados há mais sessenta anos, sendo, entretanto, improvável o desenvolvimento de uma estrutura única capaz de realizar a reativação da AChE inibida pela grande diversidade de organofosforados existentes (WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016).

Figura 5 – O mecanismo molecular da reativação da AChE pela Pralidoxima. Representação geral do processo de reativação pela oxima pralidoxima de uma enzima acetilcolinesterase fosforilada pelo organofosforado clorpirifós.



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Além da conhecida capacidade de reativação da acetilcolinesterase apresentada pelas oximas, estudos demonstram também a existência de propriedades antioxidantes nessa classe de moléculas, variando a sua eficiência de acordo com a dose administrada e a conformação da molécula em questão. Estruturalmente, os compostos da classe das oximas são caracterizadas por apresentarem capacidade nucleofílica, podendo atuar como potenciais doadores de elétrons, estabilizando a geração de radicais livres (DE LIMA PORTELLA et al., 2008 et al., 2008; PUNTEL et al., 2008, 2009; ÖZEN.; TAŞ, 2009; SUROWIAK; LOCHYŃSKI; STRUB, 2020).

2.7 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

A utilização de abordagens alternativas, como o emprego de organismos da classe dos insetos como modelo para estudos toxicológicos, principalmente com o intuito da diminuição do sacrifício de animais vertebrados vem crescendo para fins de pesquisa (MORALES, 2008). Entre as vantagens apresentadas pelos insetos existem características como rápido crescimento e alta taxa de reprodução, assim como a falta da necessidade de aprovação de comitês de ética gerando sua aplicação (SCULLY; BIDOCHKA, 2006).

A mosca da fruta, ou *Drosophila melanogaster*, é um organismo multicelular complexo pertencente à ordem Diptera e a família Drosophilidae. A utilização do gênero *Drosophila* como modelo científico é bem estabelecida, sendo amplamente empregada em estudos relacionados a doenças humanas e estudos toxicológicos (SIDDIQUE et al., 2005). Entre as vantagens na utilização desse organismo como modelo está a significativa homologia entre os genes encontrados em *D. melanogaster* para com os encontrados na espécie humana (PARVATHI et al., 2009), a existência de um complexo sistema nervoso constituído de em média 100.000 neurônios (WHITWORTH; WES; PALLANCK, 2006) e um rápido ciclo de vida aliado a um baixo custo de manutenção e infraestrutura (PARVATHI et al., 2009).

Figura 6 – O organismo modelo *Drosophila melanogaster*.



Fonte: <<http://www.yourgenome.org/stories/fruit-flies-in-the-laboratory>>

Graças a sua grande empregabilidade e o interesse direcionado ao estudo desse modelo para o tratamento de várias enfermidades, a estrutura cristalográfica

da AChE de *D. melanogaster* foi elucidada no ano 2000 (HAREL et al.,2000), sendo posteriormente atualizada no ano de 2020 (NACHON et al., 2020), permitindo um grande avanço nas informações relacionadas a sua funcionalidade e estrutura, possibilitando o emprego de diversas abordagens de análise.

2.8 Biologia Estrutural

A disponibilidade de informações relacionadas à estrutura tridimensional da enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster* permite a utilização de abordagens *in silico* com a finalidade de simular a interação entre essa estrutura e outras de interesse, propondo assim uma possível elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nesses eventos (GOHLKE; KLEBE, 2002). Dentre as abordagens *in silico* utilizadas para tal fim, encontra-se a ancoragem molecular (KITCHEN et al., 2004).

A ancoragem molecular é uma abordagem baseada na interação entre um alvo molecular e uma estrutura ligante. De modo geral, o alvo molecular é advindo de estruturas tridimensionais elucidadas através de técnicas de ressonância magnética ou cristalografia, métodos que permitem a obtenção de informações do volume, cargas e cavidades presentes nos resíduos de aminoácidos constituintes dessas estruturas. As estruturas ligantes, por sua vez, são normalmente advindas do desenho racional realizado em softwares de edição molecular, passando por métodos que conferem a elas volume, cargas e sua possível conformação espacial (KITCHEN et al., 2004).

A ancoragem molecular pode ser realizada adotando-se as estruturas envolvidas no processo como rígidas ou flexíveis, entretanto, o custo computacional empregado depende diretamente do tipo de análise. Análises em que as estruturas são adotadas como flexíveis exigem maior tempo e capacidade de processamento, assim como as que as estruturas são adotadas como rígidas, menor custo computacional e tempo de análise (MORGAN; COUTINHO, 2007).

Os resultados obtidos são de modo geral centrados nas possíveis conformações existentes entre os ligantes e alvo molecular. As possíveis conformações são também atreladas a métricas baseadas na energia de interação entre as estruturas, estas conformadas pelos tipos de ligações existentes, que

podem ser ligações de hidrogênio ou diferentes tipos de interações intermoleculares (MORGAN; COUTINHO, 2007).

As abordagens *in silico*, regularmente, como processo inicial para sua validação, são acompanhadas do emprego de abordagens *in vitro*. As abordagens *in vitro* permitem a avaliação inicial da atividade biológica dos compostos e interações previamente desenvolvidas computacionalmente. São métodos de baixo custo e fácil aplicabilidade que agem simulando os processos que naturalmente ocorrem no interior dos organismos vivos, possibilitando a averiguação da atividade dos compostos sobre variabilidades complexas, como interações moleculares envolvendo reações entre enzimas e substratos, ligações entre receptores, interações entre proteínas, indução de mortalidade e proliferação celular, alterações a nível de expressão gênica, alterações no perfil proteico, dosagens bioquímicas, entre outros (BENFENATI et al., 2010; TAN et al., 2017).

As abordagens *in vitro*, embora representem menores custos e gerem resultados semelhantes aos encontrados em ensaios utilizando organismos vivos, muitas vezes, em determinadas condições, podem ocasionar em resultados incongruentes. Ensaios *in vitro* envolvendo células ou alvos individuais, como enzimas, podem pela falta de dinâmica e complexidade de interações dos sistemas biológicos como um todo, não reproduzir com efetividade as interações moleculares existentes nos organismos vivos, necessitando, além das abordagens anteriormente citadas, do emprego de abordagens *in vivo*, onde interações mais complexas são consideradas (ANDRADE et al., 2016).

As abordagens *in vivo*, quando aliadas às informações advindas das abordagens *in silico* e *in vitro*, tal como das informações correlacionadas a um alvo terapêutico e de moléculas de interesse, permitem o delineamento de ensaios que possibilitem o desenvolvimento de anormalidades semelhantes às que ocorrem nos caracteres sobre investigação, possibilitando a determinação da empregabilidade de um modelo biológico (ANDRADE et al., 2016).

A utilização das possibilidades propiciadas pelo emprego das abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, quando em conjunto, denota ser uma interessante estratégia para compreensão dos mecanismos moleculares existentes, explorando as particularidades e possibilidades de cada técnica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar através de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo* o potencial do organismo modelo *Drosophila melanogaster* como plataforma para triagem de reativadores da enzima acetilcolinesterase.

3.2 Objetivos específicos

- Resgatar a estrutura tridimensional da enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster*, assim como a seguinte construção das estruturas tridimensionais do organofosforado Clorpirifós e das oximas K027, K048, Pralidoxima, Trimedoxima, Obidoxima, HI-6 e Metoxima;
- Propor um modelo de ligação para cada uma das estruturas valendo-se da abordagem de ancoragem molecular;
- Avaliar o potencial efeito inibitório do clorpirifós sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em *Drosophila melanogaster in vitro*;
- Avaliar o potencial das oximas K027, K048, Pralidoxima, Trimedoxima, Obidoxima, HI-6 e Metoxima em reverter a inibição *in vitro* da acetilcolinesterase induzida pelo Clorpirifós em *Drosophila melanogaster*;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* das oximas;
- Avaliar o potencial efeito do clorpirifós sobre a taxa de sobrevivência em *Drosophila melanogaster*;
- Avaliar o potencial efeito do clorpirifós sobre a atividade locomotora em *Drosophila melanogaster*;
- Avaliar o potencial efeito inibitório do clorpirifós sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em *Drosophila melanogaster in vivo*.
- Avaliar a capacidade protetora, *in vivo*, das oximas em *Drosophila melanogaster* expostas ao Clorpirifós;
- Propor a empregabilidade do organismo modelo *Drosophila melanogaster* como uma plataforma para triagem de novas oximas.

4 METODOLOGIA

4.1 Abordagem *in silico*

4.1.1 Resgate e construção das estruturas

A sequência de resíduos de aminoácidos constituintes das enzimas AChE de *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* e *Torpedo Californica* foram resgatadas através do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) e submetidas a análise de homologia através do software Clustal Omega (SIEVERS; HIGGINS, 2014). Posteriormente a estrutura tridimensional da enzima AChE desses organismos, *D. melanogaster* (PDB: 6XYS), *M. musculus* (PDB: 2GYV), *H. sapiens* (PDB: 5HQ3) e *T. Californica* (PDB: 1EA5) foram resgatadas através do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) e submetidas a sobreposição de sua conformação estrutural através do software Chimera 1.12 (PETTERSEN et al., 2004). O resgate das estruturas tridimensionais das oximas K027, K048, K075, Pralidoxima, Trimedoxima, Obidoxima, HI-6 e Metoxima, quando disponíveis, foram realizados através do banco de dados PubChem. A estrutura molecular fosforilada da enzima AChE de *D. melanogaster* para os ensaios de reativação *in silico* foi então construída valendo-se do software Avogadro 1.2.0 (HANWELL, 2012). Os resíduos de aminoácidos constituintes do sítio Gorge foram selecionados e salvos em um arquivo no formato PDB, sendo a porção fosfato do organofosforado clorpirifós então covalentemente ligada ao grupo hidroxila do resíduo de aminoácido Serina 238, conformante da tríade catalítica. A estrutura foi então otimizada utilizando o campo de força MMFF94 (HALGREN, 1996), com a porção fosfato sendo considerada flexível e os resíduos de aminoácido constituintes do sítio Gorge, rígidos. A geometria molecular final do sítio ativo fosforilado foi selecionada e adicionada no arquivo original da AChE nativa de *D. melanogaster*, conformando a forma putativa da enzima fosforilada. As estruturas tridimensionais das oximas, quando não disponíveis foram construídas valendo-se do software Avogadro 1.2 (HANWELL, 2012), sendo sua otimização geométrica realizada através do software MOPAC2016 (STEWART, 2016).

4.1.2 Ancoragem Molecular

Os ensaios dos possíveis modos de ligação entre a estrutura tridimensional da enzima Acetilcolinesterase fosforilada com as oximas K027, K048, Pralidoxima, Trimedoxima, Obidoxima, HI-6 e Metoxima, foram realizados valendo-se do software de modelagem molecular Molegro Virtual Docker 7.0 (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006), seguindo as otimizações das estruturas como indicado. O software Molegro Virtual Docker calcula as energias de interação existentes entre os ligantes (reativadores da enzima AChE) e um receptor (enzima AChE). Os resultados são apresentados pelo MolDock Score, métrica representativa da afinidade e modo de ligação de um determinado ligante (pose) ao sítio receptor alvo, sendo dado em kcal/mol. De modo geral, a estrutura tridimensional da enzima AChE de *D. melanogaster* em sua forma nativa (PDB: 6XYS) foi utilizada para averiguação da capacidade dos ligantes se completarem na região conhecida como sítio ativo. Os procedimentos de ancoragem foram realizados com os ligantes sendo considerados flexíveis e o receptor rígido, sendo as análises realizadas no modo padrão, com uma resolução de 0,3 angstroms, MolDock SE com 10 corridas e cavidade de varredura constituinte do sítio Gorge. Um total de 50 diferentes poses foram executados para cada oxima. As poses alocadas em uma distância $O_{ox} - P_{op}$ (d_{op}) $< 10.00 \text{ \AA}$ e ângulo $O_{ox} - P_{op} - O_{Ser238}$ (θ_{opo}) $= 180 \pm 60^\circ$ foram então resgatadas e organizadas por base em suas energias de interação. A pose com menor energia de interação foi adotada como a possível conformação adotada pela oxima quando em ataque nucleofílico à serina fosforilada. Os resultados do docking foram analisados através da utilização do software Discovery Studio Visualizer v20.1.0.19295 (BIOVIA, 2017).

4.2 Abordagem *in vitro*

4.2.1 Organismo Modelo

Espécimes de *Drosophila melanogaster* foram condicionados em tubos de vidro contendo meio de cultura padrão, sendo mantidos em sala com temperatura (24°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas controlados.

4.2.2 Reagentes

Clorpirifós pestanal, sacarose, ácido 5,5 ditiobis 2-nitrobenzóico, albumina de soro bovino, iodeto de acetiltiocolina, HEPES foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). As oximas avaliadas foram cedidas pelo Doutor Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil), tendo sido gentilmente concedidas pelo Doutor Kamil Kuca (Universidade de Defesa e Faculdade Militar de Ciências da Saúde, República Tcheca).

4.2.3 Preparo das amostras

Para a realização dos ensaios *in vitro*, 200 espécimes fêmeas de *Drosophila melanogaster*, possuindo entre 1 - 4 dias de idade foram homogeneizadas em homogeneizador PowerLyzer® a 2000 vibrações por minuto durante 20 segundos em 4ml de tampão HEPES (20mM; pH 7,0), sendo posteriormente centrifugadas a 1000 x g durante 5 minutos em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então filtrado, sendo posteriormente empregado para dosagem de proteína pelo método de BRADFORD (BRADFORD, 1976) e análises posteriores.

4.2.4 Determinação CI_{50}

A determinação da concentração de clorpirifós efetiva em inibir a atividade enzimática da acetilcolinesterase *in vitro* foi realizada com a exposição do sobrenadante proveniente do homogenato de *D. melanogaster* a diferentes concentrações do composto organofosforado clorpirifós. O clorpirifós foi pesado e diluído em etanol e tampão HEPES (20mM; pH 7,0) na proporção de 1:1, sendo posteriormente incubado em conjunto com o homogenato de *D. melanogaster* por um período de 40 minutos. Baseando-se na concentração de 44µM de clorpirifós, capaz de realizar a inibição de 50% da atividade enzimática, a concentração de 10µM, passível da inibição da atividade enzimática em 25% foi escolhida para os ensaios posteriores. A avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase foi

realizada a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), valendo-se do espectrofotômetro Agilent Cary 60® UV-Visível.

4.2.5 Efeito das oximas sobre a atividade enzimática *in vitro*

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi mensurada de acordo com o protocolo de ELLMAN (ELLMAN et al., 1961), método baseado na velocidade de produção da tiocolina, tiol originado da hidrólise da acetiltiocolina pelas colinesterases. A tiocolina possui a característica de reagir com o ácido 5,5' -ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando um ânion de coloração amarela, denominado nitrobenzoato, possuindo absorção de 412 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, contendo um grupo controle, um grupo exposto ao organofosforado Clorpirifós e outro ao Clorpirifós em conjunto com as oximas K027, K048, Pralidoxima, Trimedoxima, Obidoxima, HI-6 e Metoxima. O grupo controle foi conformado por 100µl de amostra e 100µl de tampão HEPES. O segundo grupo, conformado por 100µl de amostra, 90µl de tampão HEPES (20mM; pH 7,0) e 10µl do organofosforado Clorpirifós, na concentração final de 10 µM. O terceiro grupo, conformado por 100µl de amostra, 50µl de tampão HEPES (20mM; pH 7,0) e 10µl do organofosforado Clorpirifós, na concentração final de 10 µM. Neste, após 40 minutos de incubação foram adicionados 50µl da oxima em questão, totalizando a concentração final de 100 µM, 10 vezes superior à concentração do inibidor administrada. A avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase foi realizada a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), valendo-se do espectrofotômetro Agilent Cary 60® UV-Visível.

4.2.6 Determinação da atividade antioxidante das oximas *in vitro*

4.2.6.1 Atividade antioxidante das oximas pelo método DPPH

A capacidade de sequestro do radical DPPH das oximas foi mensurada de acordo com o protocolo de BALTRUŠAITYTĖ (BALTRUŠAITYTĖ et al., 2007). O ensaio DPPH é baseado na atividade de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH). O DPPH por ser uma molécula deficiente de elétrons, possui a característica de quando na presença de uma molécula antioxidante, receber elétrons, resultando na sua redução e consequente formação do difenil-picril-hidrazina. Inicialmente o DPPH possui coloração púrpura, entretanto, quando reduzido a DPPH reduzido, passa a apresentar coloração amarela. Para o ensaio

DPPH, 100µl de DPPH (300µM) diluídos em etanol foram misturados com 20µl de cada oxima em questão (10µM) em placa de microtitulação de 96 poços. O volume final de cada poço foi ajustado para 300µl com etanol. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) após 45 minutos de incubação, a 515 nm. O ensaio foi realizado utilizando o ácido ascórbico como controle positivo para determinação do valor máximo de sequestro do radical DPPH. Os valores são expressos em porcentagem de inibição da absorbância do radical DPPH em relação ao controle.

4.2.6.2 Atividade antioxidante das oximas pelo método ABTS

O ensaio ABTS é baseado na atividade de eliminação do radical 2,20-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). O ABTS quando na presença de moléculas antioxidantes tende a receber elétrons, resultando na sua redução e consequente formação de ABTS. Inicialmente O ABTS+ possui coloração azul esverdeada, entretanto, quando reduzido a ABTS, passa a apresentar perda de coloração. Para o ensaio ABTS, 200µl de solução ABTS+ foram misturadas a 10 µl de cada oxima em questão (10µM) em uma microplaca de 96 poços. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) após 10 minutos de incubação, a 734 nm. O ensaio foi realizado utilizando o ácido ascórbico como controle positivo para determinação do valor máximo de sequestro do radical ABTS. Os valores são expressos em porcentagem de inibição da absorbância do radical ABTS em relação ao controle.

4.2.7 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância (One Way), ANOVA, seguida do teste post-hoc de Tukey quando necessário. Análises de correlação entre os resultados advindos da atividade antioxidante e da reativação da enzima acetilcolinesterase foram realizados através do coeficiente de correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas valendo-se da utilização do software GraphPad Prism 6.0, sendo consideradas significativas quando $p < 0,5$.

4.3 Abordagem *in vivo*

4.3.1 Organismo Modelo

Os espécimes de *Drosophila melanogaster* foram condicionados conforme o item 4.2.1.

4.3.2 Reagentes

Os reagentes empregados foram utilizados conforme listado no item 4.2.2.

4.3.3 Determinação CL₅₀

Para determinação da concentração de Clorpirifós efetiva em causar a mortalidade de 50% da população no tratamento *in vivo* e a posterior concentração a ser utilizada no decorrer dos experimentos, 30 espécimes fêmeas de *D. melanogaster*, possuindo de 1-4 dias de idade foram alocadas em tubos de vidro contendo algodão suplementado com sacarose 1% e diferentes concentrações do organofosforado clorpirifós. O Clorpirifós foi pesado e diluído em etanol e sacarose 1%, na proporção 1:1 em diferentes concentrações, sendo posteriormente administrado aos tubos contendo os espécimes de *Drosophila melanogaster*. Os indivíduos sobreviventes foram contabilizados após um período de 24 horas e uma curva de mortalidade com as diferentes concentrações do organofosforado clorpirifós foi realizada. Baseando-se na concentração de 1,182 ppm de clorpirifós, capaz de ocasionar a letalidade de 50% dos espécimes de *D. melanogaster* em um período de 24 horas, a concentração subletal de 0,75 ppm foi escolhida para os ensaios posteriores.

4.3.4 Sobrevivência, atividade locomotora e efeito das oximas

Para realização dos ensaios de sobrevivência e atividade locomotora, apenas as oximas que apresentaram os melhores resultados *in vitro* foram empregadas. 30 espécimes fêmeas de *Drosophila melanogaster*, possuindo entre 1 - 4 de idade foram alocadas em tubos de vidro contendo algodão suplementado com sacarose 1%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, contendo um grupo controle, um grupo exposto ao organofosforado clorpirifós e outro ao clorpirifós em conjunto com as oximas. O grupo controle foi conformado apenas por sacarose 1%. O segundo grupo, conformado por sacarose 1% e o organofosforado Clorpirifós na concentração de 0,75 ppm. O terceiro grupo, conformado por sacarose 1%,

clorpirifós na concentração de 0,75 ppm e as oximas de interesse na concentração de 1,5 ppm. O Clorpirifós e as oximas foram pesados e diluídos em etanol e sacarose 1%, na proporção 1:1, sendo posteriormente administrados aos tubos contendo os espécimes de *Drosophila melanogaster*, tendo os indivíduos mortos em períodos de 24 horas contabilizados e expressos em porcentagem de moscas sobreviventes em relação ao controle. Posteriormente à realização dos ensaios de mortalidade, os indivíduos sobreviventes a cada período de 24 horas foram submetidos ao ensaio de geotaxia negativa coletiva. 10 Indivíduos advindos de cada grupo de tratamento foram anestesiados e alocados em tubos de vidro por um período de 30 minutos para aclimação. Posterior a aclimação, foram alocados em tubos plásticos medindo 25 centímetros de comprimento e 1,5 centímetros de diâmetro, tendo então sua capacidade de escalada contabilizada. Os ensaios foram baseados na capacidade dos espécimes de *D. melanogaster* de ascensão de 6cm em 6 segundos, sendo os testes coletivos repetidos 3 vezes com 20 segundos de intervalo para cada grupo de 10 espécimes. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle.

4.3.5 Efeito das oximas sobre a atividade enzimática *in vivo*

Para determinação do efeito das oximas sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) *in vivo*, apenas as oximas que apresentaram os melhores resultados *in vitro* foram empregadas. 20 espécimes fêmeas de *Drosophila melanogaster* advindos de cada grupo de tratamento foram homogeneizados em tampão HEPES (20mM; pH 7,0). As amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm pelo período de 30 minutos, em uma temperatura de 4°C. Os sobrenadantes advindos dessas centrifugações foram empregados para a avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (ELLMAN et al., 1961). Todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente (25 ±1 °C), valendo-se do espectrofotômetro Agilent Cary 60® UV-Visível.

4.3.6 Análises Estatísticas

A análise estatística dos resultados será realizada através da análise de variância (One Way), ANOVA, seguida do teste post-hoc de Tukey quando necessário. Análises de comparação entre dois grupos experimentais foram realizadas através do emprego do teste de t Student. Todas as análises estatísticas

serão realizadas valendo-se da utilização do software GraphPad Prism 6.0, sendo consideradas significativas quando $p < 0,5$.

5 APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

A inibição da enzima acetilcolinesterase e a indução de estresse oxidativo são importantes mecanismos envolvidos com a toxicidade ocasionada por diferentes compostos organofosforados, entre eles o clorpirifós. Existem moléculas conhecidas como oximas que podem reverter esse cenário, conferindo a reabilitação da acetilcolinesterase. O modo como esses mecanismos podem ocorrer em *Drosophila melanogaster* são sugeridos no decorrer dessa discussão.

5.1 Abordagem *In silico*

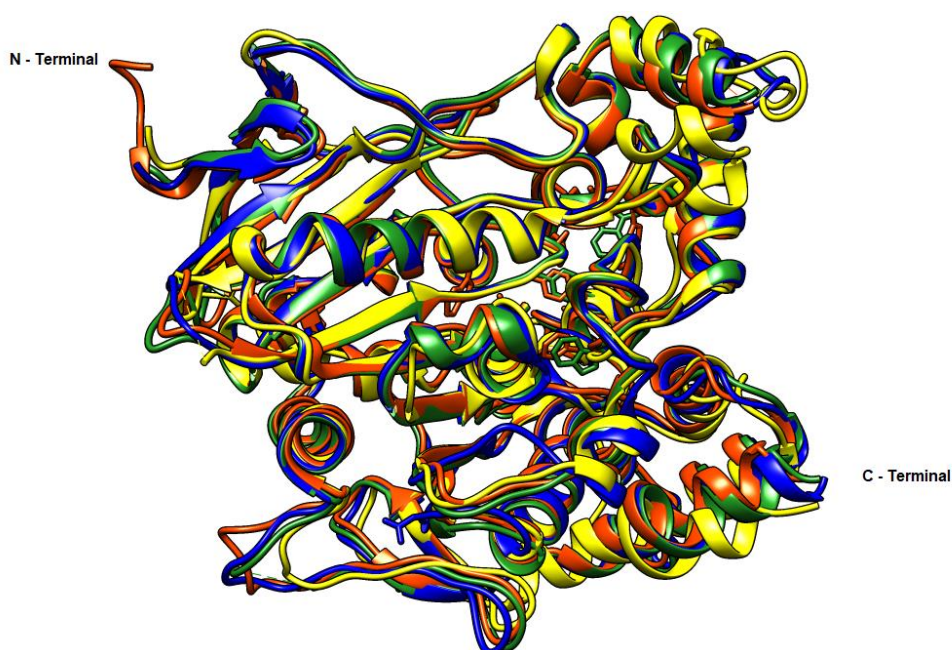
5.1.1 A enzima AChE de *D. melanogaster*

A enzima AChE é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético, encerrando assim, as transmissões sinápticas (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987). Esse mecanismo crucial para os organismos é conservado em uma ampla gama de organismos, incluindo os insetos (PEZZEMENTI; CHATONNET, 2010). Em *D. melanogaster* existem diversas alterações na constituição da enzima AChE (FOURNIER et al., 1993; YAO et al., 1997). Como resultado decorrente dessas alterações, estão os cerca de 34,8% de semelhança com a estrutura primária de *T. californica* que a estrutura primária AChE de *D. melanogaster* apresenta, os 37,2% de semelhança com a estrutura primária de *H. sapiens* e 36,5% de similaridade com a estrutura primária de *M. musculus*. Essa característica pode ser explicada através do quão evolutivamente as espécies em questão são aproximadas, já que a semelhança de sequência encontrada entre *T. californica* e *H. sapiens* gira em torno de 53%, seguida de 83,6% entre *M. musculus* e *H. sapiens*. Esses valores embora representem uma baixa similaridade, não retratam o alto grau de correlação existente na sobreposição estrutural entre as enzimas (HAREL et al, 2000). O alinhamento entre as sequências é disponibilizado no apêndice 1 para melhor visualização.

A sobreposição estrutural das enzimas AchE demonstrou que a estrutura tridimensional da AChE de *D. melanogaster* apresenta alto grau de similaridade com as estruturas advindas de *T. californica*, *H. sapiens* e *M. musculus*, com desvio médio quadrático (RMSD - *Root Mean Square Deviation*) de 0,93 Å. O RMSD é empregado com o intuito da realização de uma comparação átomo a átomo de cada estrutura, sendo a métrica mais utilizada para sobreposições estruturais entre

proteínas. Quanto menor o valor dado ao RMSD, mais próximas são as conformações adotadas (COUTSIAS; WESTER, 2019). As maiores diferenças encontradas na questão estrutural situam-se nas alças externas e porção C-terminal das enzimas, regiões distantes do sítio ativo, tendo essas diferenças provavelmente pouca ou nenhuma influência nas suas funções biológicas. A sobreposição entre as estruturas é representada na figura 6 para melhor compreensão.

Figura 7 – Comparação das estruturas tridimensionais das AChEs. Comparação da estrutura tridimensional das enzimas AChEs de *D. melanogaster* (amarelo), *H. sapiens* (verde), *T. californica* (azul) e *Mus musculus* (laranja)



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

A enzima AChE de *D. melanogaster*, assim como a enzima AChE dos organismos vertebrados, possui em sua estrutura, a existência de uma cavidade denominada sítio Gorge, responsável por alocar os subsítios ativos da enzima. Os resíduos constituintes do sítio Gorge em *D. melanogaster* são listados na tabela 1. Dentre os resíduos constituintes do sítio Gorge da AChE de *D. melanogaster*, destacam-se para a atividade catalítica da enzima os resíduos de aminoácido Ser238, His480, Glu367, conformantes do sítio esterásico, Trp321 resíduo chave do sítio periférico, Trp271 bolso acila, Trip83 bolso colina e Gli150, Gli151, Ala239 conformantes da cavidade oxianiónica (HAREL et al, 2000). Esses resíduos, como

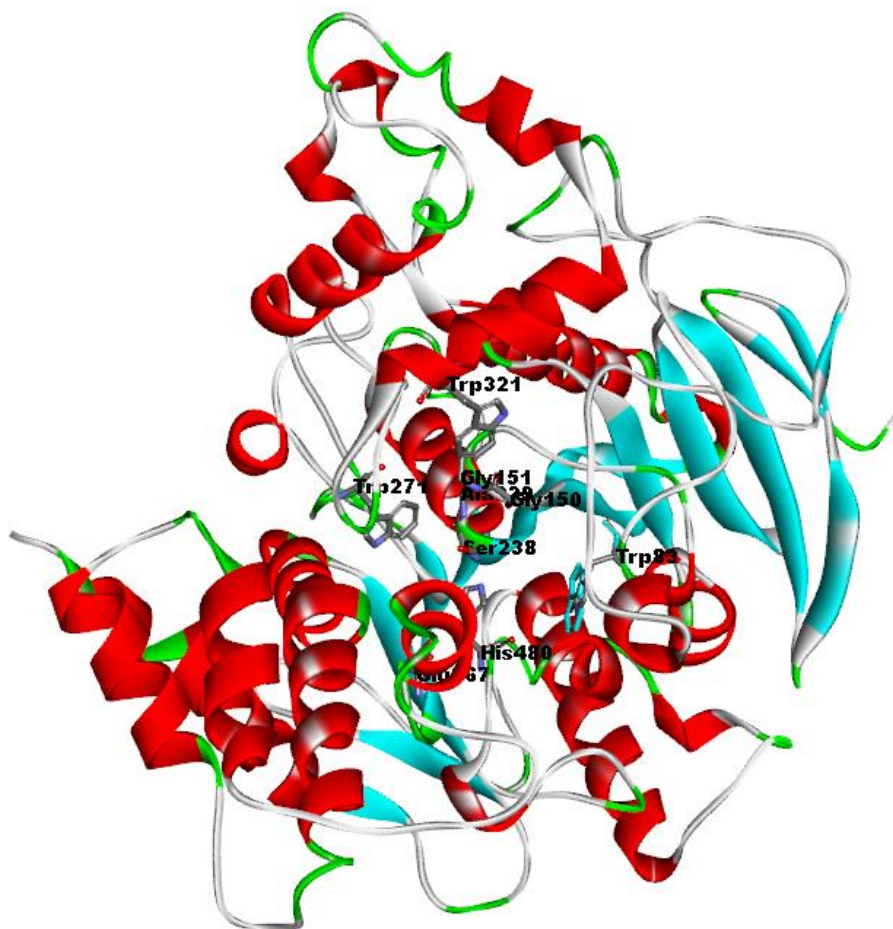
visto anteriormente, possuem uma boa sobreposição com os resíduos constituintes dos sub-sítios da enzima AChE de vertebrados, demonstrando o quão conservada entre diferentes espécies é a enzima acetilcolinesterase (HAREL et al, 2000). Os resíduos são destacados na figura 6 para melhor compreensão.

Tabela 1 – **Resíduos constituintes do sítio Gorge.** Resíduos constituintes do sítio Gorge da enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster*.

Resíduos constituintes do sítio Gorge de <i>D. melanogaster</i>
Tyr162, Ile484, Tyr148, Glu237, Gly481, Gly149, Ser238, Gly155, Trp83, Gly150, His480, Thr154, Gly151, Trp472, Glu80, Trp271, Tyr370, Met153, Phe371, Leu328, Phe330, Arg70, Tyr71, Glu69, Tyr374, Trp321, Glu72, Tyr324, Tyr73, Asp375

Fonte: Adaptado de HAREL et al., 2000.

Figura 8 – **Estrutura tridimensional da enzima AChE.** Estrutura tridimensional da enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster*.



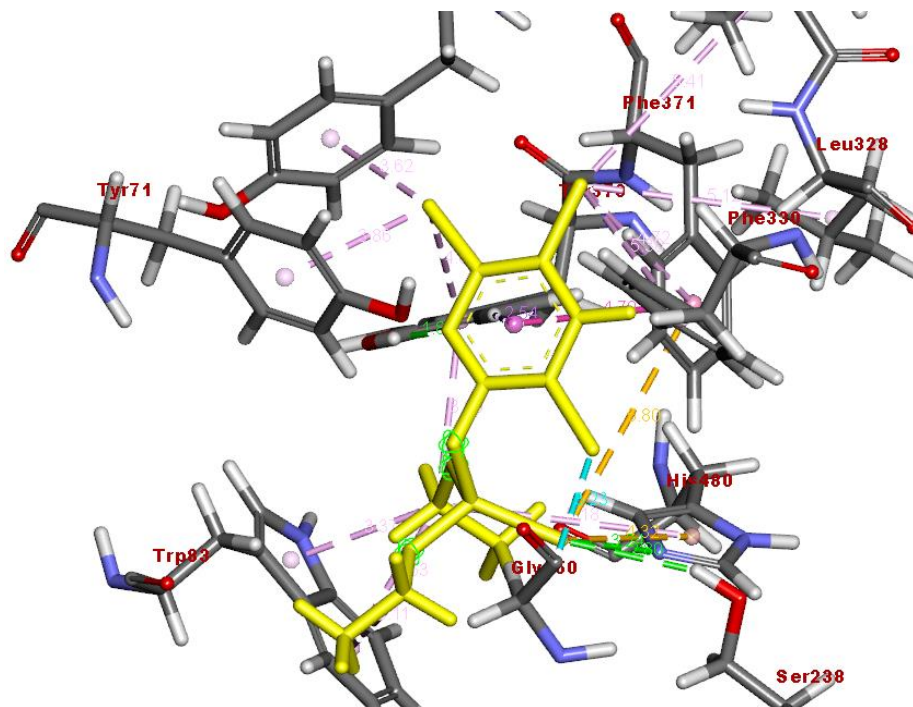
Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Sendo assim, com base na disponibilidade de informações referentes tanto a estrutura tridimensional da enzima AChE de *D. melanogaster* quanto da estrutura de diferentes compostos inibidores e possíveis reativadores enzimáticos, investigou-se a empregabilidade *in silico* do organismo modelo *D. melanogaster* como uma plataforma de triagem de compostos reativadores da enzima AChE.

Para isso, primeiramente, ensaios de ancoragem molecular utilizando a estrutura da enzima AChE de *D. melanogaster* (6XYS) em sua totalidade foram realizados com a intenção de averiguar a capacidade de acesso do clorpirifós-oxon, a forma biotransformada do clorpirifós, ao sítio Gorge. Essa etapa se fez necessária devido às diversas mutações já identificadas na enzima AChE de diferentes insetos (FOURNIER et al., 1993; YAO et al., 1997), em *D. melanogaster*, essas mutações ocasionam na diminuição do espaço pertencente ao sítio Gorge em cerca de 50% do espaço existente na AchE de mamíferos, além de alterações no potencial eletrostático da enzima, características que dificultam o acesso de substâncias inibidoras ao sítio esterásico (HAREL et al, 2000).

Os resultados obtidos demonstraram que o clorpirifós-oxon possui acesso e interação com diversos resíduos constituintes do sítio Gorge da enzima Tyr71, Trp83, Gly150, Ser238, His480, Phe371, Leu328 e Tyr370, que por sua vez, possivelmente contribuem para a estabilização do clorpirifós nesta região. Dentre os resíduos, destacam-se as interações existentes entre o clorpirifós e os resíduos Gly150 (cavidade oxianiônica), Trp83 (bolso colina), His480 e Ser238 (sítio esterásico). O resíduo Ser238 é caracterizado por ser o resíduo chave da tríade catalítica da enzima AchE de *D. melanogaster*, sendo responsável pelo mecanismo de hidrólise apresentado pela enzima AchE. A ligação entre o clorpirifós e a Ser238 ocasiona na fosforilação do resíduo de serina, ocasionando no impedimento da hidrólise da acetilcolina e seu conseqüente aumento na fenda sináptica. Essas interações são demonstradas na figura 7 para melhor visualização.

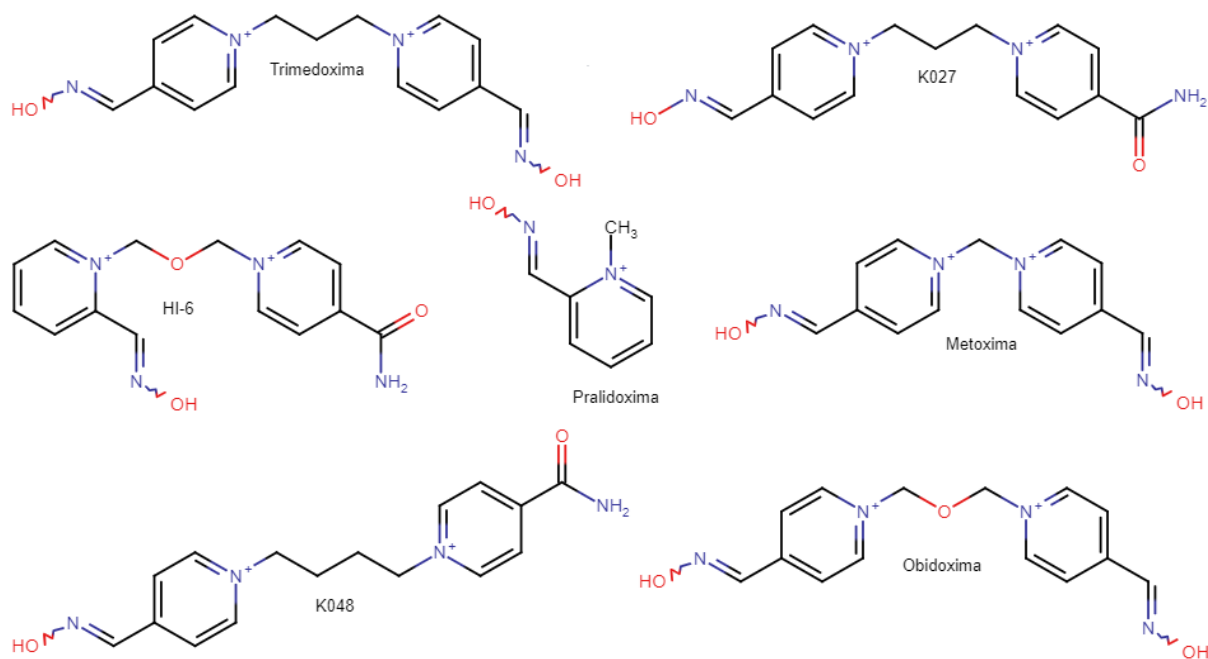
Figura 9 – Clorpirifós e o sítio Gorge da AchE de *D. melanogaster*. Interações existentes entre o organofosforado clorpirifós e o sítio Gorge da enzima AchE de *D. melanogaster*, entre eles Tyr71, Trp83, Gly150, Ser238, His480, Phe371, Leu328 e Tyr370.



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

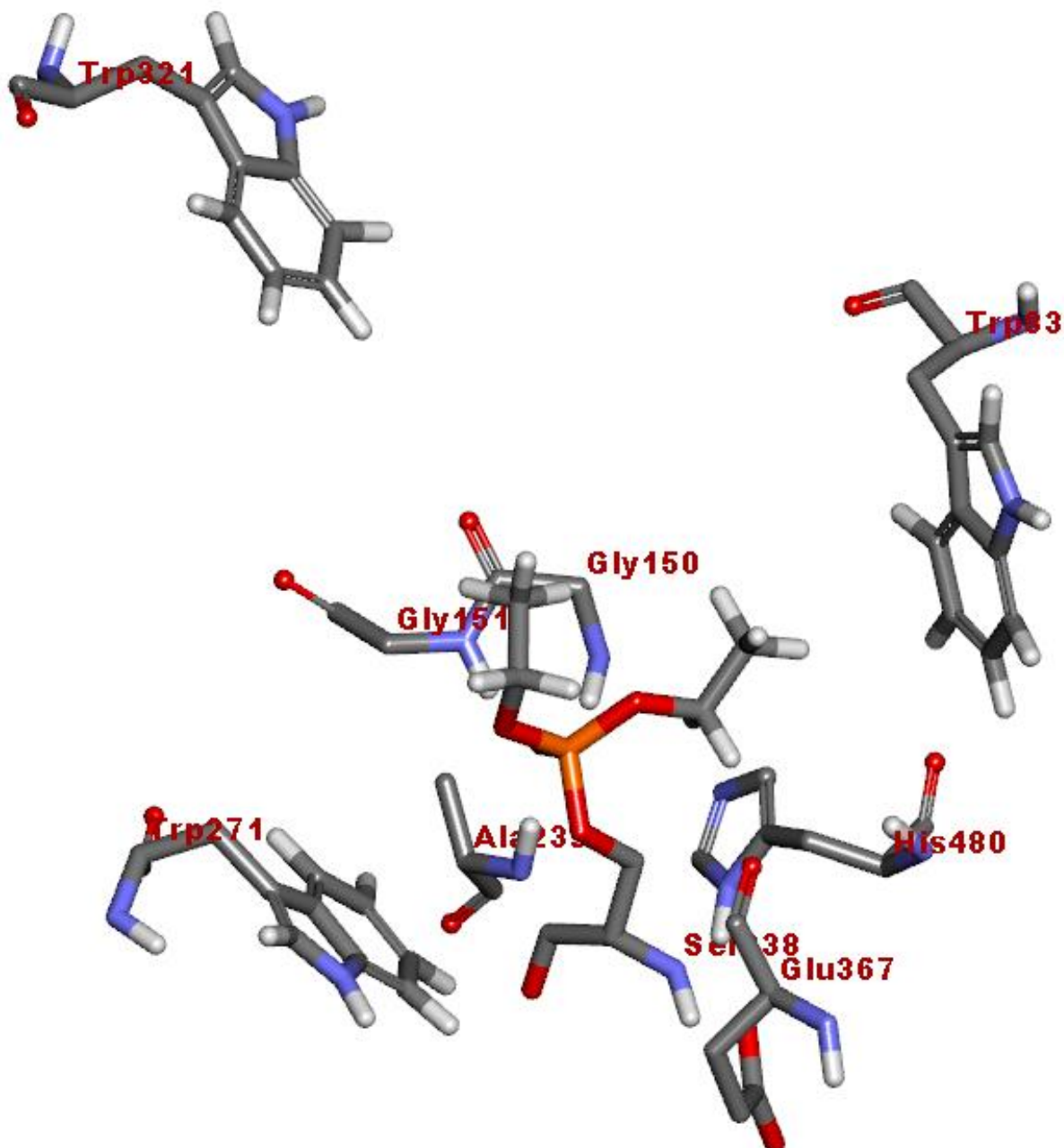
Desse modo, para investigar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos no processo de reativação da enzima AChE de *D. melanogaster* pelas oximas pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6, metoxima, K027 e K048, (demonstradas na figura 9), o resíduo de Ser238 fosforilado pelo organofosforado clorpirifós-oxon foi construído. Para isso optou-se pela utilização de todos os resíduos constituintes do sítio Gorge, tendo como objetivo a obtenção da correta posição do grupo fosforil do organofosforado clorpirifós-oxon ligado ao resíduo de Ser238 na tríade catalítica da enzima AchE de *D. melanogaster*, como demonstrado na figura 8.

Figura 10 – **Estruturas químicas das oximas.** Estruturas químicas das oximas K027, K048, Pralidoxima, Trimedoxima, Obidoxima, HI-6 e Metoxima.



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Figura 11 – **Sítio ativo da acetilcolinesterase de *D. melanogaster***. Resíduos de aminoácidos constituintes do sítio ativo da acetilcolinesterase de *D. melanogaster*. A porção fosforil do organofosforado clorpirifós-oxon e os resíduos de aminoácidos His480, Ser238, Glu367, Gly150, Gly151, Ala239, Trp321, Trp271 e Trp83 são mostrados na figura.



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

5.1.2 Ensaio de ancoragem molecular

O mecanismo molecular clássico envolvido nos processos de restauração da atividade hidrolítica da enzima AchE pelos compostos da classe das oximas se dá pelo estabelecimento do anel piridínico positivamente carregado presente na oxima para com o subsítio aniônico periférico negativamente carregado. O alinhamento entre essas duas estruturas permite que a porção oxima do reativador se aproxime do grupo fosforil acoplado ao grupo hidroxila da serina pertencente à tríade catalítica existente no sítio esterásico, realizando um ataque nucleofílico, rompendo a ligação existente e reativando a enzima para sua atividade catalítica (GONÇALVES et al., 2006).

O modo com que esses mecanismos moleculares se dão no processo de reativação da enzima AchE de *D. melanogaster* complexadas com um inibidor são desconhecidos. Sendo assim, com o objetivo de propor um modelo de ligação entre as estruturas moleculares das oximas pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6, metoxima, K027 e K048 frente à estrutura tridimensional da enzima AChE de *D. melanogaster*, diferentes ensaios de ancoragem molecular foram realizados com a estrutura tridimensional da enzima AChE de *D. melanogaster* (6XYS) em sua forma fosforilada.

A seleção das melhores poses foi realizada segundo Kuca et al., 2018, baseando-se na distância existente entre o oxigênio da porção nucleofílica da oxima e o fósforo do organofosforado ($O_{ox} - P_{op}$ (d_{op}) $< 10.00 \text{ \AA}$), assim como a angulação existente entre o oxigênio da porção nucleofílica da oxima, o fósforo do organofosforado presente na Ser238 e o oxigênio ligado covalentemente ao fósforo ($O_{ox} - P_{op} - O_{Ser238}$ (θ_{opo}) = $180 \pm 60^\circ$). A métrica apresenta caráter qualitativo e embora não represente o mecanismo clássico de reativação existente entre as oximas e a serina fosforilada, demonstra tanto a afinidade da estrutura com o receptor quanto a conformação adotada pela estrutura que pode ser favorável para o processo de reativação da enzima. As poses dentro dos critérios e com as menores distâncias entre o oxigênio da oxima e o fósforo da serina fosforilada foram adotadas como possível representação do mecanismo existente no processo de reativação de cada oxima em conjunto com a enzima AchE de *D. melanogaster* fosforilada.

Além das poses, como métrica para comparação do potencial associativo de todas as estruturas com a enzima AChE de *D. melanogaster*, a tabela 2 demonstra, através do MolDock Score, algoritmo referente a energia de ancoramento molecular, quais as possíveis oximas mais efetivas em um processo de reativação. Quanto menor a energia, maior a afinidade do ligante para com o receptor (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Nossos resultados demonstram que todas as oximas, exceto a pralidoxima, apresentam energias similares de interação com os resíduos constituintes do sítio Gorge da enzima AChE de *D. melanogaster*. O principal causador da discrepância nos valores de interação das oximas deve-se possivelmente à conformação que possuem. A pralidoxima apresenta estrutura diferenciada em relação às demais oximas avaliadas, apresentando um anel piridínico em sua conformação, ao invés de dois anéis piridínicos apresentados pelas oximas trimedoxima, obidoxima, HI-6, metoxima, K027 e K048. Estruturas de oximas bi-piridínicas, por possuírem cerca do dobro do tamanho encontrado nas oximas mono-piridínicas acabam possivelmente propiciando uma maior interação com os resíduos de aminoácido existentes no receptor, abrangendo com maior efetividade a cavidade disponível na estrutura tridimensional da enzima, ocasionando assim em menores valores de energias de interação. A metodologia empregada, onde o receptor (AChE) é considerado rígido e apenas o ligante flexível também pode influenciar nos resultados obtidos, já que impossibilita uma melhor aproximação e conformação das estruturas empregadas nos ensaios de ancoragem, principalmente com a pralidoxima, que apresenta conformação estrutural menor. As oximas trimedoxima, obidoxima, HI-6, metoxima e K027 não apresentaram grandes variações entre as energias de interação apresentadas. A oxima K048 apresentou a menor energia de interação para com os resíduos de aminoácidos presentes no receptor, essa maior afinidade pode ser ocasionada pela ligeiramente maior conformação estrutural apresentada pela oxima. A presença de um ou mais grupos oximas ligados aos anéis piridínicos das oximas avaliadas, não aparenta influenciar nas afinidades apresentadas para com a AChE fosforilada de *D. melanogaster*. Anteriormente o mesmo tipo de diferenciação nas energias de interação foi demonstrado entre oximas mono e bipyridínicas na enzima AchE de *H. sapiens* (KUCA et al., 2018).

A enzima AChE de *D. melanogaster* apresenta diversas alterações em diferentes resíduos de aminoácidos (FOURNIER et al., 1993). A presença dessas alterações acarreta na existência de resíduos aromáticos adicionais não existentes na enzima AChE de mamíferos, entre estes encontram-se os resíduos Tyr71, Tyr370 e Met153. Os resíduos Tyr71, Tyr370 e Met153 na AChE de *D. melanogaster* resultam graças a forte atuação sinérgica em um afunilamento de 4,5 Å no canal conformante do sítio Gorge, delimitando o acesso por diferentes moléculas ao sítio ativo da enzima presente na parte posterior ao afunilamento. Essa porção, além de possuir acesso delimitado, conta com uma diminuição de cerca de 50% em relação à cavidade presente na AchE de mamíferos, diminuindo ainda mais a possibilidade de acoplamento de moléculas inibitórias (HAREL et al., 2000). Com base nisso, avaliamos a capacidade de acesso das oximas pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6, metoxima, K027 e K048, assim como as conformações assumidas pelos reativadores para com a enzima AChE de *D. melanogaster* fosforilada pelo organofosforado clorpirifós.

Tabela 2 – **Melhores poses, energias e interações.** Tabela demonstrando as melhores poses obtidas, resíduos de aminoácidos constituintes do sítio Gorge e suas respectivas energias de interação para com as diferentes oximas.

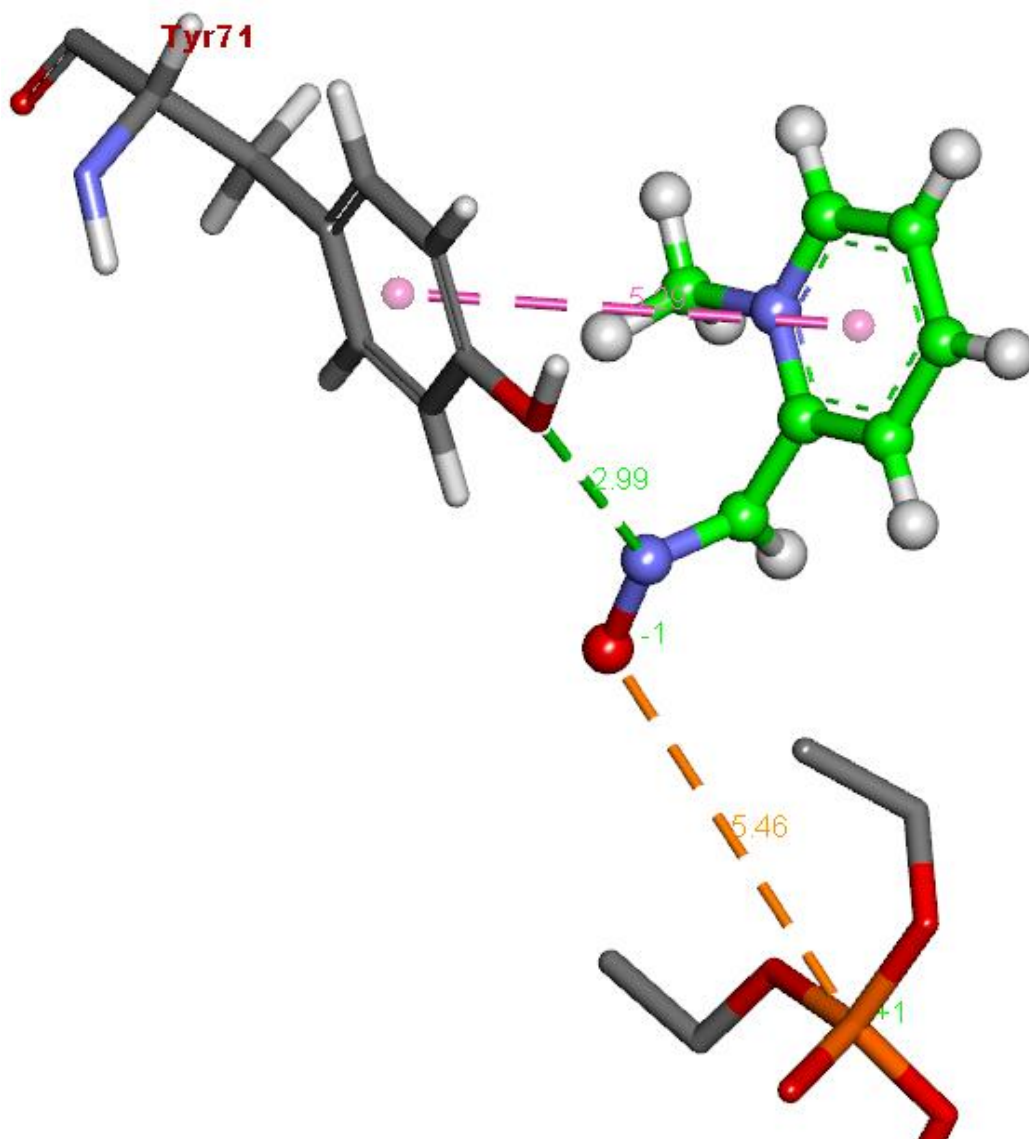
Oxima	Melhores Poses			Interações
	d_{OP}	θ_{OPO}	MolDock kcal/mol	
Pralidoxima	5,46Å	138,65°	- 59,302	<i>Tyr71</i>
Trimedoxima	5,42Å	140,53°	- 112,597	<i>Trp321, Tyr324, Tyr71, Phe371</i>
Obidoxima	6,76Å	140,56°	-112,815	<i>Tyr73, Tyr324, Phe371, Trp321</i>
Metoxima	5,98Å	142,40°	-102,916	<i>Tyr370, Tyr324, Trp321, Phe371</i>
HI-6	6,11Å	139,52°	-102,648	<i>Tyr71, Tyr324, Trp321, Ile327</i>
K027	5,53Å	136,19°	-118,546	<i>Trp321, Ile327, Tyr324, Phe371, Tyr73</i>
K048	5,53Å	140,77°	-122,936	<i>Trp321, Tyr73, Phe371, Tyr324</i>

Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Pralidoxima

A oxima pralidoxima, composta por um anel piridínico, apresenta o valor mais positivo de interação com os resíduos constituintes do sítio Gorge, - 59,302 kcal/mol, demonstrando pouca interação com os resíduos de aminoácidos constituintes do sítio Gorge. Estabelece ligações de hidrogênio e π - π com o resíduo Tyr71. A distância existente entre o oxigênio da oxima e o fósforo da serina é de 5,46Å. As interações são demonstradas na figura 12 para melhor visualização.

Figura 12 – **Pralidoxima e o sítio Gorge da enzima AChE de *D. melanogaster*.** Representação bidimensional das interações existentes entre a Pralidoxima com o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster*.

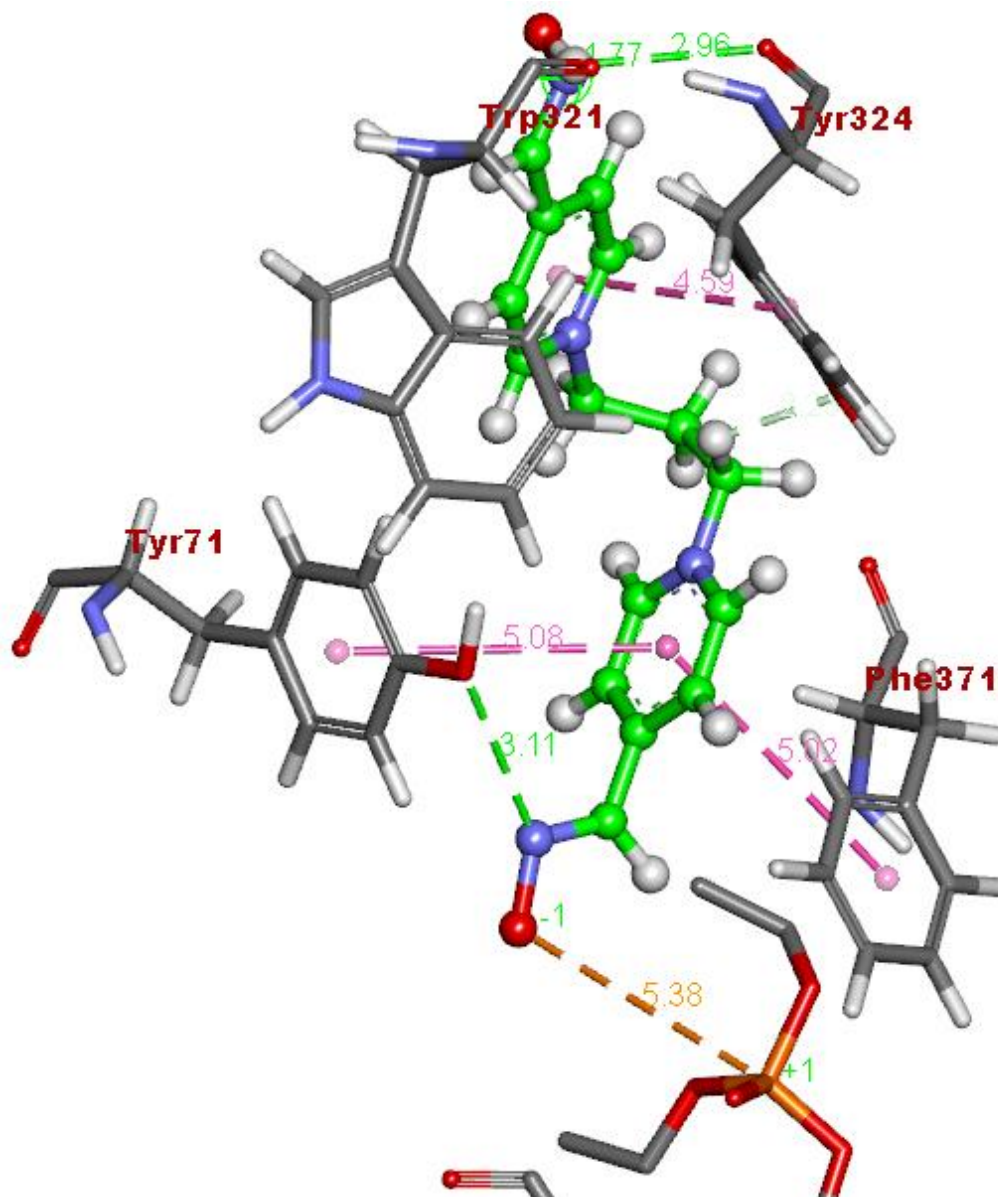


Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Trimedoxima

A oxima trimedoxima apresentou o valor de interação com os resíduos do sítio Gorge de - 112,597 kcal/mol, possuindo ligações de hidrogênio com os resíduos Trp321, Tyr324 e Tyr71, assim como ligações π - π T-shaped com os resíduos Tyr324, Phe371 e Tyr71. A distância existente entre o oxigênio da oxima e o fósforo do organofosforado é de 5,38 Å. As interações são demonstradas na figura 13 para melhor visualização.

Figura 13 – **Trimedoxima e o sítio Gorge da enzima AChE de *D. melanogaster*.** Representação bidimensional das interações existentes entre a Trimedoxima com o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster* fosforilada.

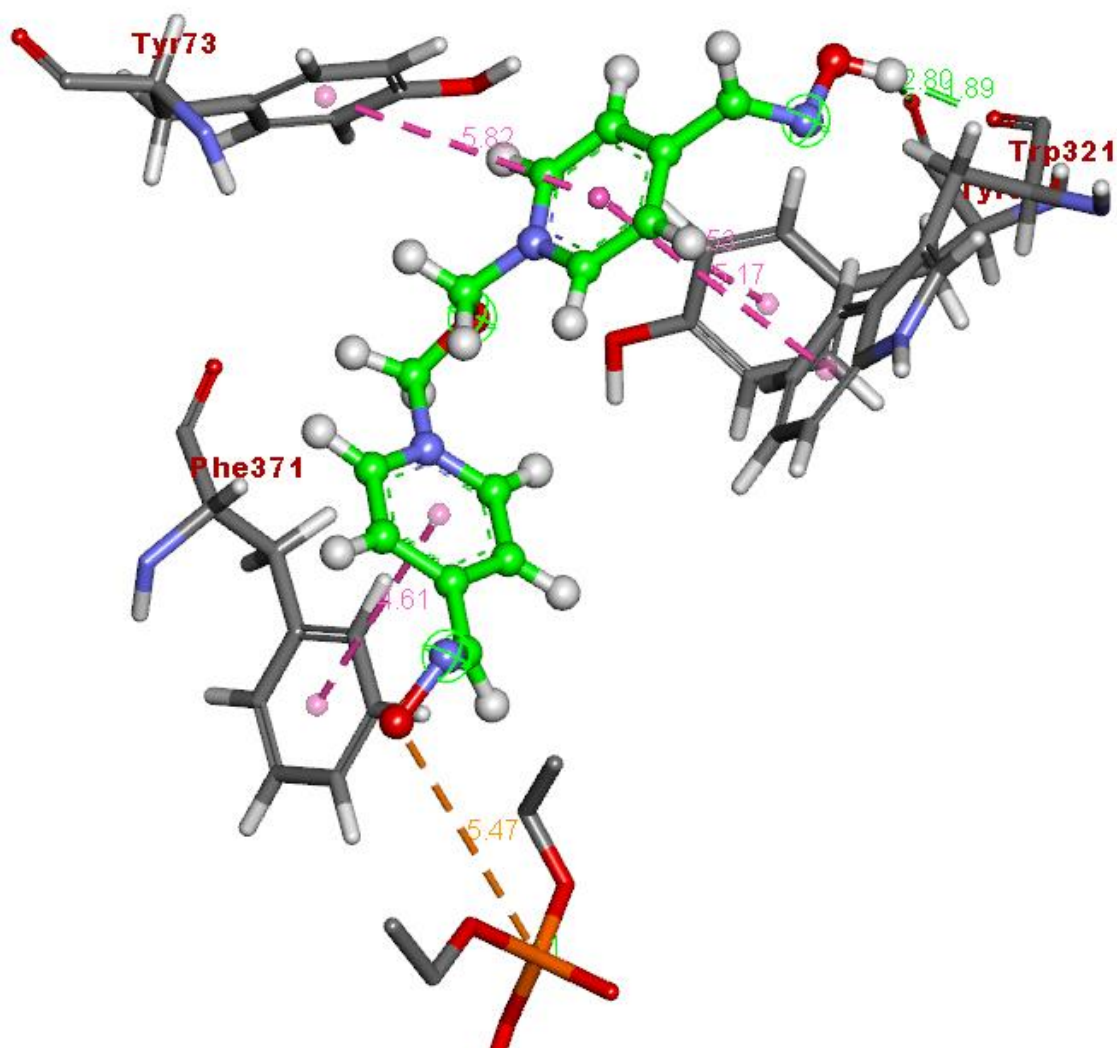


Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Obidoxima

A oxima obidoxima apresentou o valor de interação com os resíduos do sítio Gorge de -113,476, apresentando ligações de hidrogênio com os resíduos Trp321 e Tyr324, assim como ligações π - π stacking com os resíduos Tyr73, Phe371, Trp321 e Tyr324. A distância existente entre o oxigênio da oxima e o fósforo da serina é de 5,47Å. As interações são demonstradas na figura 14 para melhor visualização.

Figura 14 – **Obidoxima e o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster*.** Representação bidimensional das interações existentes entre a Obidoxima com o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster* fosforilada.

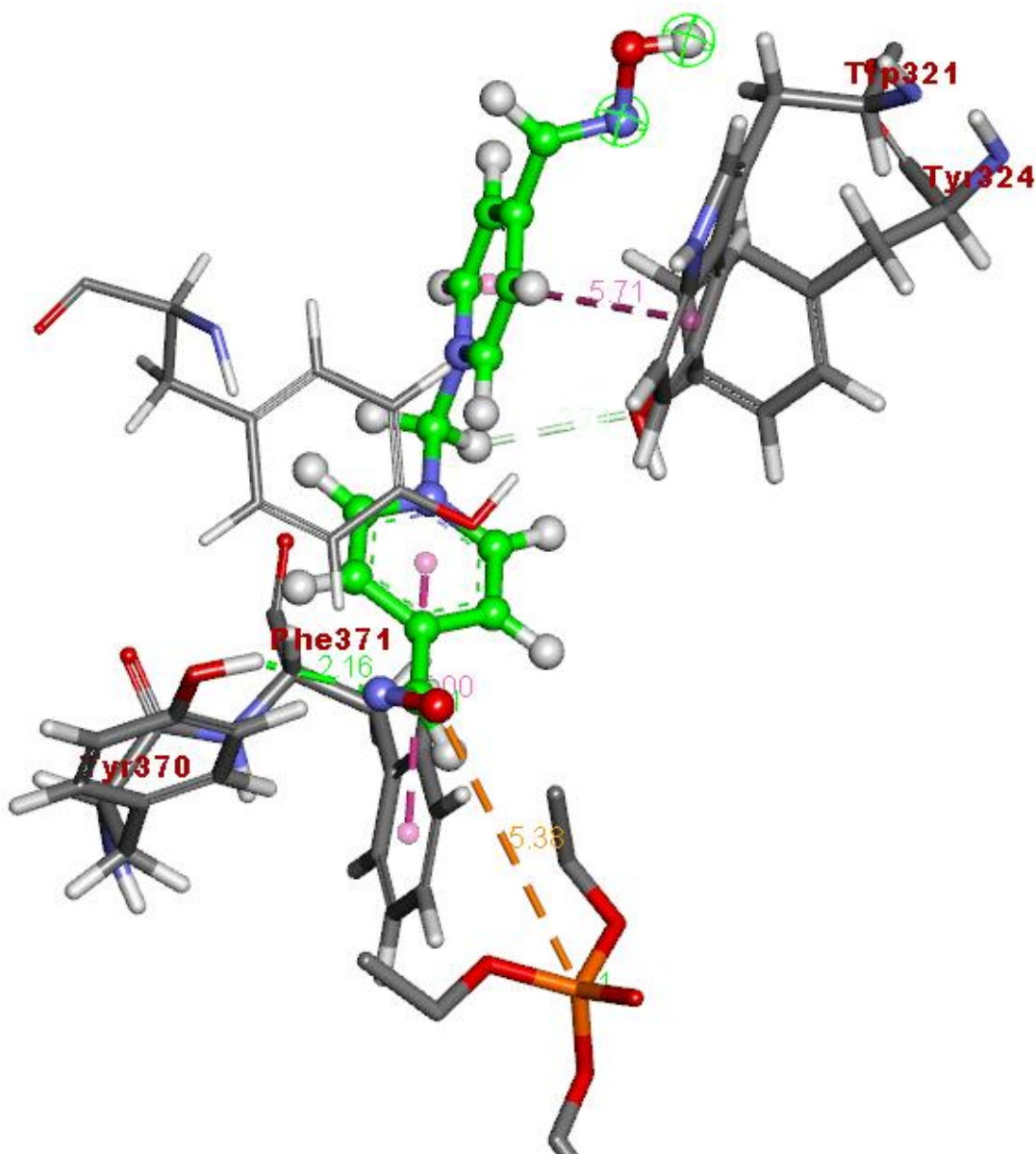


Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Metoxima

A oxima metoxima apresentou valor de interação com os resíduos constituintes do sítio Gorge de -102,916 kcal/mol, valendo-se de ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr370 e Tyr324, além de ligações π - π envolvendo os resíduos Trp321 e Phe371. A distância existente entre o oxigênio da oxima e o fósforo do organofosforado é de 5,38 Å. As interações são demonstradas na figura 15 para melhor visualização.

Figura 15 – **Metoxima e o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster*.** Representação bidimensional das interações existentes entre a Metoxima com o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster* fosforilada.

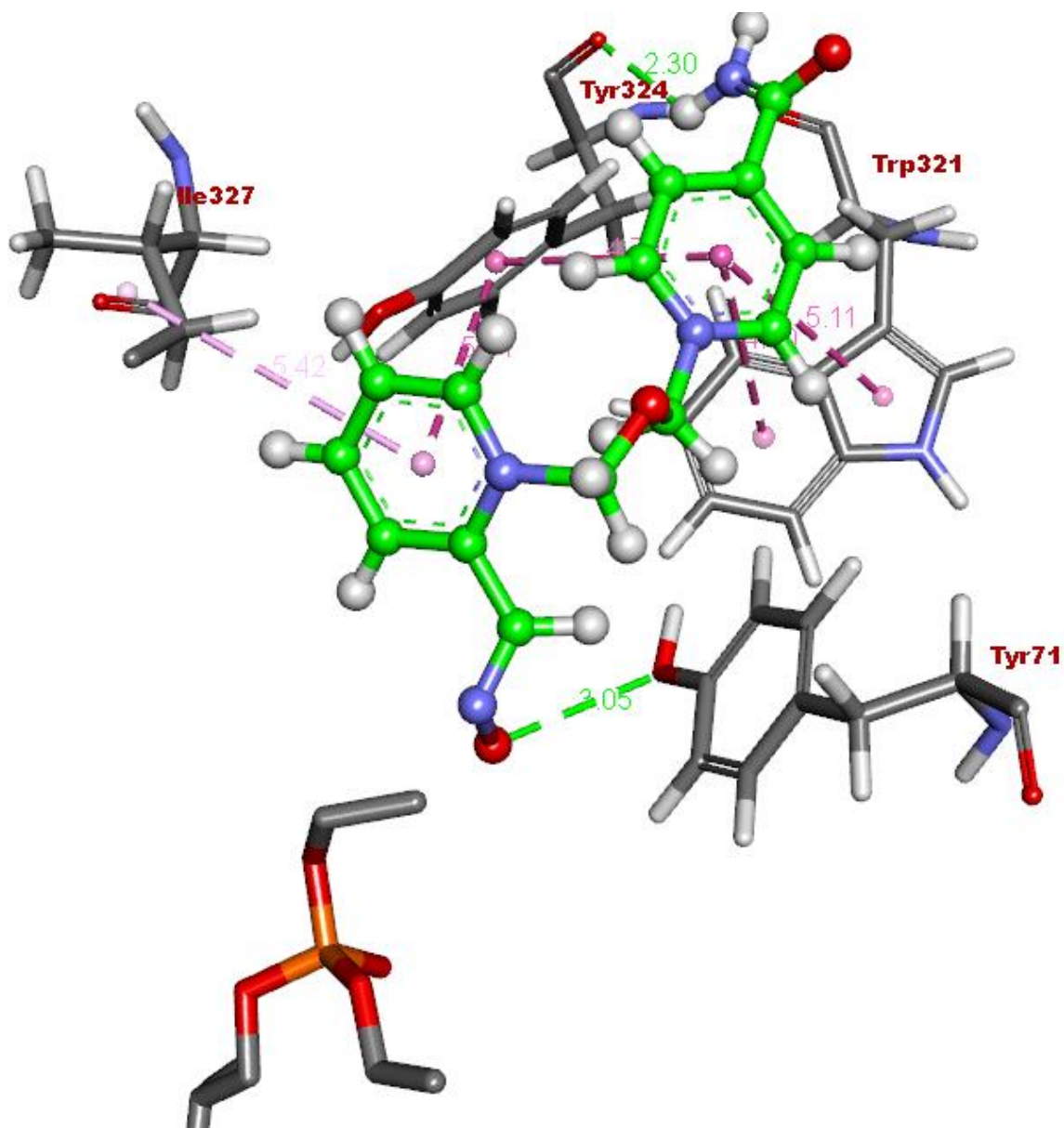


Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

HI-6

A oxima HI-6 apresentou valor de interação com os resíduos constituintes do sítio Gorge de -102,648 kcal/mol, apresentando ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr370, Tyr71 e Tyr324, assim como ligações π - π com os resíduos Trp321, Tyr374 e Ile327. A distância existente entre o oxigênio da oxima e o fósforo do organofosforado presente na serina fica em 6,11 Å. As interações são demonstradas na figura 16 para melhor visualização.

Figura 16 – HI-6 e o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster*. Representação bidimensional das interações existentes entre a HI-6 com o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster* fosforilada.

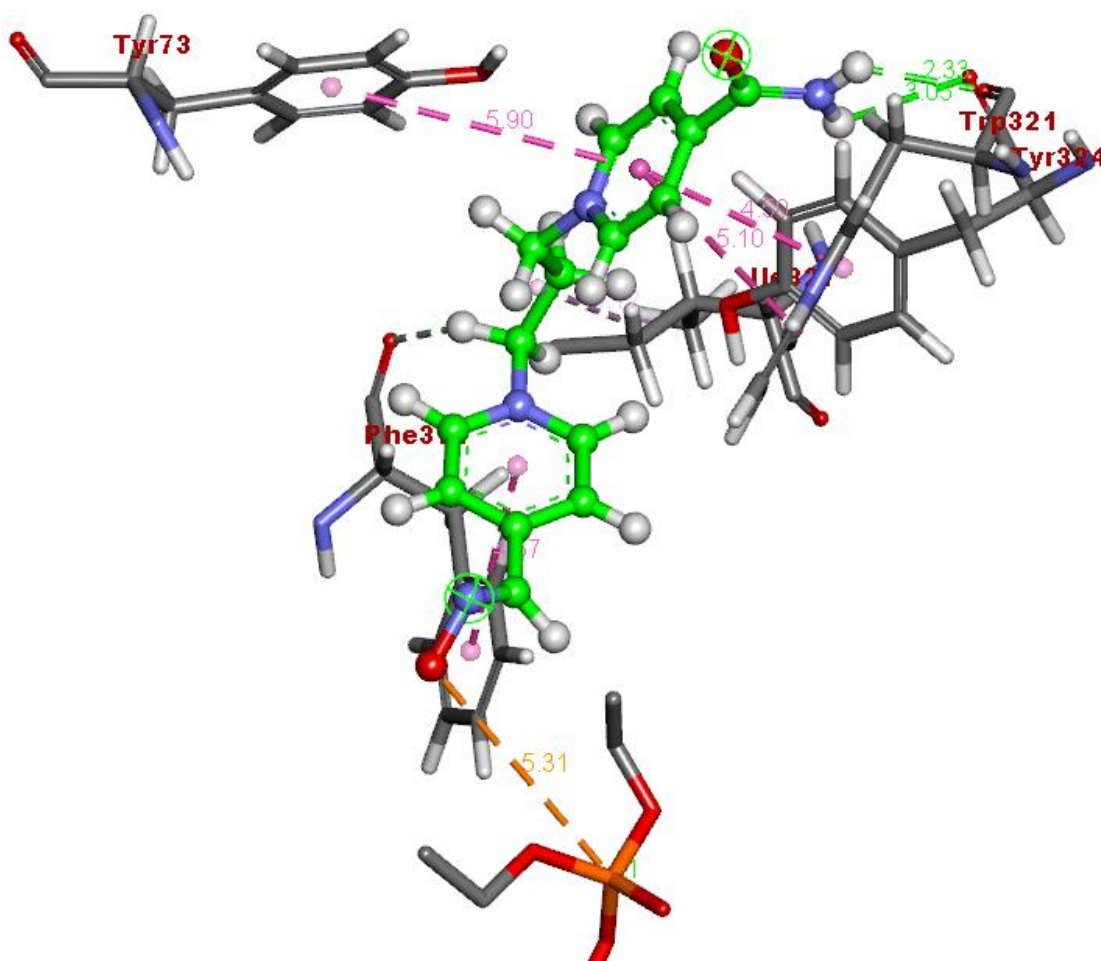


Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

K027

A oxima K027 apresentou valor de interação com os resíduos constituintes do sítio Gorge de -118,546 kcal/mol, estabelecendo ligações de hidrogênio com os resíduos Trp321 e Tyr324, assim como ligações π - π stacking com os resíduos Phe371, Tyr73, Tyr324 e Trp321. A distância existente entre o oxigênio da oxima e o fósforo do organofosforado presente na serina fica em 5,31 Å. As interações são demonstradas na figura 17 para melhor visualização.

Figura 17 – K027 com o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster*. Representação bidimensional das interações existentes entre a K027 com o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster* fosforilada.

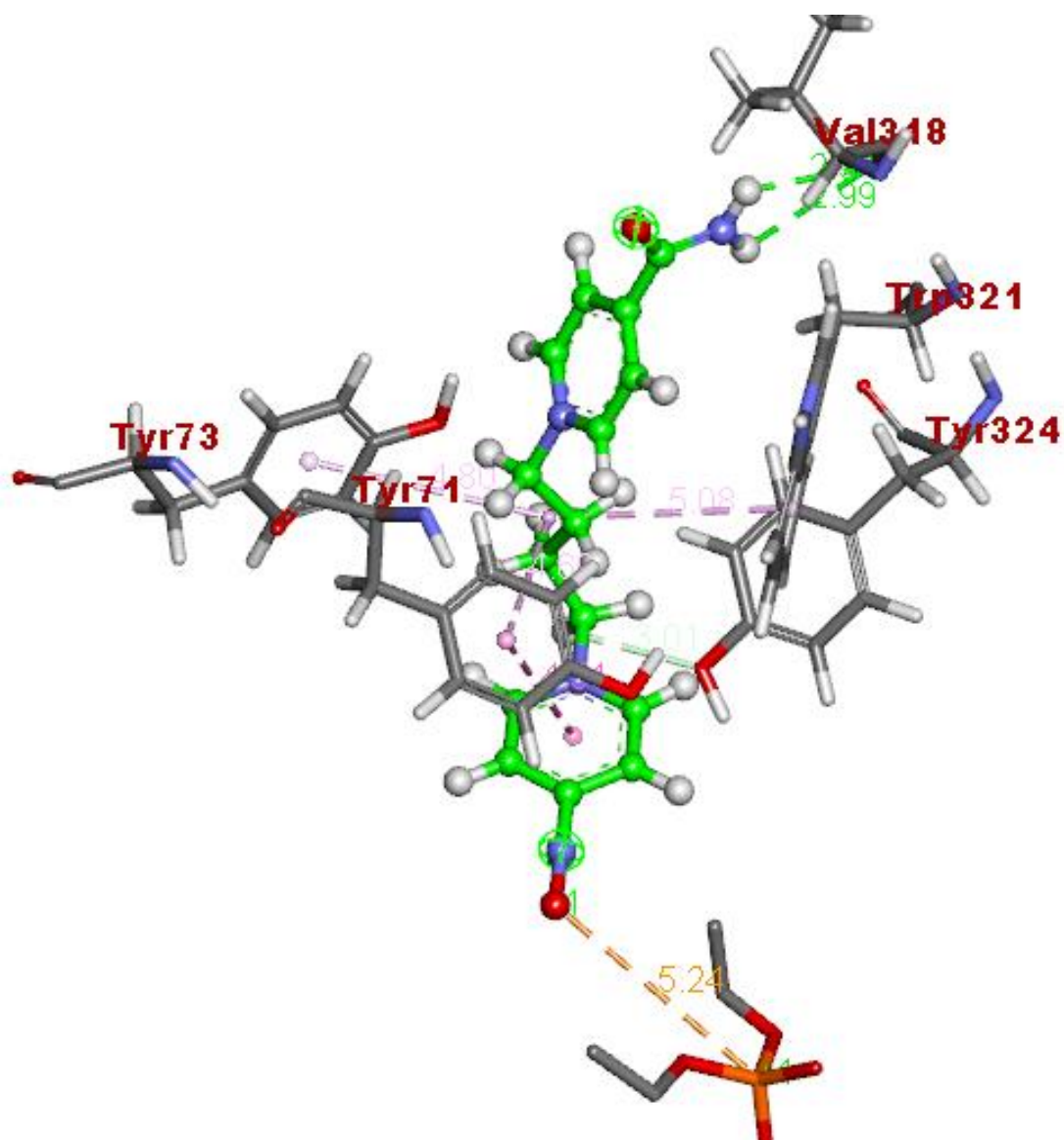


Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

K048

A oxima K048 apresentou o maior valor de interação com os resíduos constituintes do sítio Gorge, cerca de -122,936 kcal/mol, valendo-se de ligações de hidrogênio com os resíduos Val318 e Tyr324, além de ligações π - π com os resíduos Tyr71, Trp321 e Tyr73. A distância existente entre o oxigênio da oxima e o fósforo do organofosforado presente na serina fica em 5,24 Å. As interações são demonstradas na figura 18 para melhor visualização.

Figura 18 – **K048 com o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster*.** Representação bidimensional das interações existentes entre a K048 com o sítio Gorge da enzima AChE *D. melanogaster* fosforilada.



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

As análises de ancoragem molecular demonstraram que as diferentes oximas avaliadas possuem capacidade de acesso e ligação ao sítio Gorge da enzima AChE de *D. melanogaster*, assim como interação com seus resíduos de aminoácido, entretanto, nenhuma das oximas avaliadas apresentou o estabelecimento de interações com o subsítio aniônico periférico da enzima AChE de *D. melanogaster* (Trp83), apresentando distâncias variando de 5,42Å e 6,76Å entre o oxigênio das oximas avaliadas e a Ser238 fosforilada pelo clorpirifós. As mutações presentes na enzima AChE de *D. melanogaster*, com destaque para aquelas existentes no sítio Gorge, que acarretam em seu afunilamento e menor tamanho, provavelmente propiciam o estabelecimento de interações entre a estrutura das oximas e os resíduos Tyr71, Trp321, Tyr324, Phe371, Tyr73, Tyr370 e Ile327 da enzima, que embora auxiliem na orientação e estabilização das oximas, podem acarretar no seu ancoramento nessa região, dificultando o acesso ao sítio esterásico da enzima e a consequente interação com a Ser238. As conformações obtidas nos ensaios *in silico*, assim como seus graus de especificidade e afinidade são intrínsecas aos tipos de interações intermoleculares existentes entre os ligantes e o receptores, podendo ser baseadas em ligações de hidrogênio ou diferentes tipos de interações intermoleculares, como forças eletrostáticas ou diferentes tipos de interações hidrofóbicas (DE CASTRO et al., 2020), podendo ser traduzidas, em meio biológico, como de suma importância para o reconhecimento e estabelecimento entre as diferentes estruturas moleculares.

Em suma, o estabelecimento de conformações dentro dos parâmetros definidos para a zona de ataque, tornam pertinente a complementação da abordagem *in silico* com ensaios pertencentes a abordagem *in vitro* para verificação da possível capacidade de reativação da AChE de *D. melanogaster* inibida pelo organofosforado clorpirifós, principalmente pela característica das predições computacionais que embora sejam de grande valia para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos de interações intermoleculares, representam uma visão probabilística das conformações entre os ligantes e o alvo molecular, podendo os mecanismos serem ainda influenciados pela dinâmica e flexibilidade existentes nas estruturas, permitindo alterações no volume disponível

para ligação no sítio ativo e conseqüentemente nas distâncias e tipos de ligações estabelecidas (KITCHEN et al., 2004).

5.2 Abordagem *In vitro*

5.2.1 Efeito das oximas sobre a atividade da enzima AChE *in vitro*

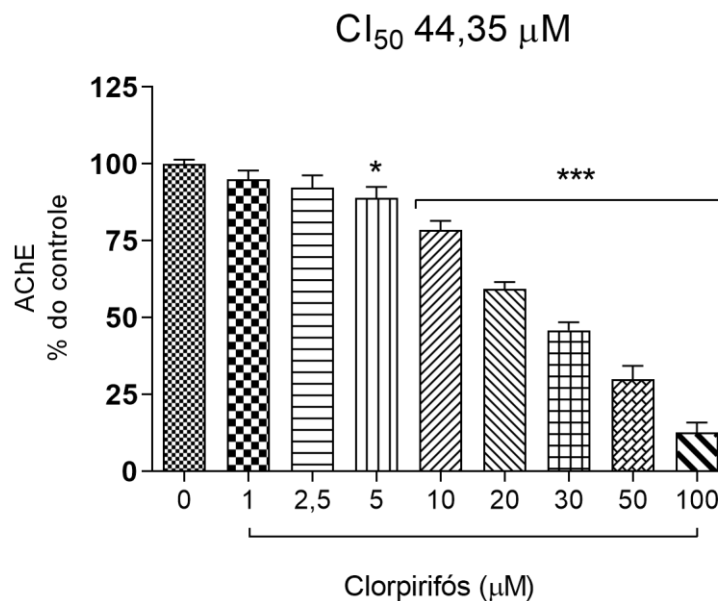
O clorpirifós é um dos compostos organofosforados mais utilizados como inseticida no mundo. É empregado tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, sendo utilizado de grandes plantações a aplicações residenciais (RAHMAN et al., 2021). O principal mecanismo de toxicidade apresentado pelos compostos organofosforados, como o clorpirifós, se baseia na inibição da enzima AChE pela fosforilação do seu sítio ativo (RAHMAN et al., 2021). Dentre os fatores que influenciam essa inibição está a afinidade entre o composto organofosforado e a estrutura da enzima AChE. Maiores afinidades podem resultar em taxas de envelhecimento ocorrendo de maneira mais rápida, menores, em taxas de envelhecimento ocorrendo de maneira mais lenta. Muitos são os compostos inibidores da enzima AChE, apresentando diversas estruturas. Devido a essa grande variabilidade estrutural, vários são os compostos reativadores desenvolvidos, todos como uma tentativa de obtenção de um reativador mais eficaz (WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016). A efetividade dos reativadores, compostos da classe das oximas, está relacionada com o período de tempo após a intoxicação em que são administradas e a afinidade que possuem com o complexo organofosforado-enzima, permitindo com maior ou menor eficácia o deslocamento da porção fosforil e a conseqüente liberação da enzima para atividade catalítica (CAVALCANTI et al., 2016; WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016). Além da procura por novos reativadores mais eficientes, existe em paralelo, a possibilidade de obtenção de organismos modelo alternativos para investigação e triagem de novos compostos reativadores tanto de inibições ocasionadas por clorpirifós, quanto por outros compostos organofosforados, entre estes organismos, *Drosophila melanogaster*.

Com esse objetivo, sabendo-se que os compostos organofosforados como o clorpirifós possuem entre seus principais mecanismos de toxicidade a inibição da enzima AChE, investigou-se o potencial efeito inibitório do clorpirifós sobre a atividade da enzima AChE em *D. melanogaster in vitro*, bem como a capacidade das oximas K027, K048, pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6 e metoxima em

realizar a reativação *in vitro* da enzima AChE de *D. melanogaster* inibida pelo organofosforado em questão.

Os homogenatos de *D. melanogaster* foram incubados na presença de diferentes concentrações de clorpirifós. A concentração efetiva em inibir 50 % da atividade enzimática (CI_{50}) foi de aproximadamente 44 μ M de clorpirifós. A partir deste resultado, a concentração 10 μ M, responsável por uma inibição de aproximadamente 25% da atividade AChE, foi atribuída como opção de escolha para os ensaios posteriores de reativação com as oximas. Os resultados são demonstrados na figura 17 para melhor visualização.

Figura 19 – **Determinação da CI_{50} do organofosforado clorpirifós.** Dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). * $p < 0,05$ em relação ao controle e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

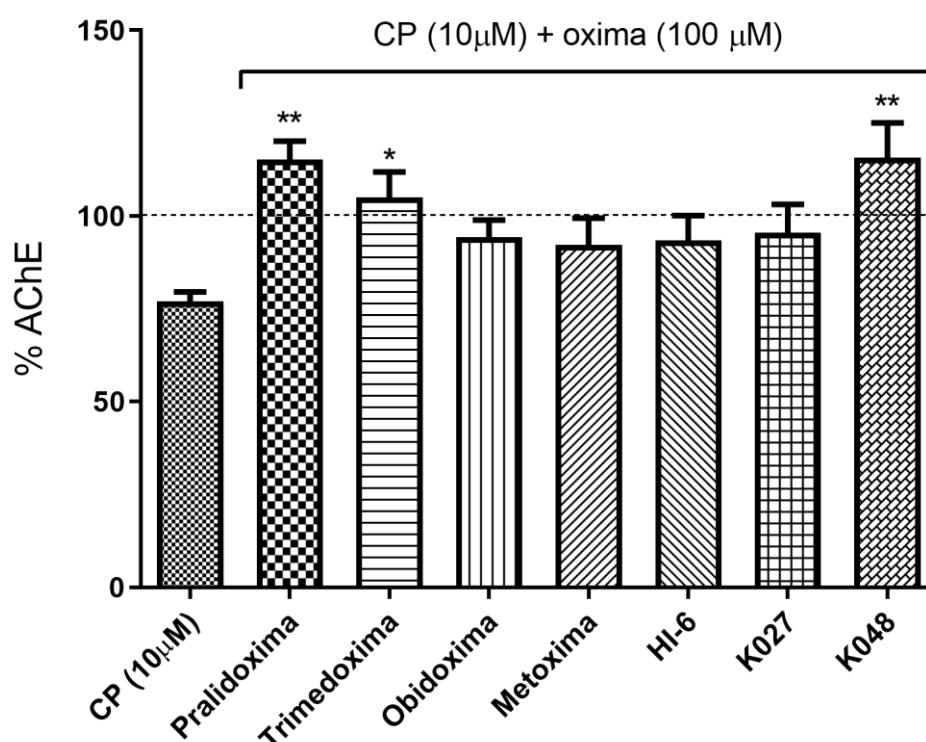


Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Os homogenatos de *D. melanogaster* foram então incubados na presença de 10 μ M de clorpirifós, além da adição das oximas, K027, K048, pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6 e metoxima nas concentrações finais de 100 μ M. A concentração final de 100 μ M de cada oxima foi atribuída como opção de escolha por permitir a possibilidade de saturação das condições do ensaio para verificação do potencial de deslocamento da porção fosforil do organofosforado presente na

Ser238 do sítio ativo da enzima AChE de *D. melanogaster* pelas oximas administradas. Os resultados são demonstrados na figura 18 para melhor visualização.

Figura 20 – **Potencial de reativação das oximas.** Potencial de reativação das diferentes oximas avaliadas perante a inibição da enzima AChE de *D. melanogaster* proveniente da inibição ocasionada pelo organofosforado clorpirifós. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CP e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo CP.



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

As oximas que apresentaram a maior taxa de reativação da enzima AchE de *D. melanogaster* nas condições *in vitro* foram a pralidoxima e a oxima da série K, K048, ambas com aproximadamente 38% de reativação em relação a inibição proveniente da exposição ao clorpirifós. Estruturalmente a pralidoxima é conformada por uma estrutura menor, apresentando um anel piridínico, sendo a oxima K048 conformada por uma estrutura maior, com dois anéis piridínicos. Todas as outras oximas avaliadas, trimedoxima (28,3%), K027 (17,6%), obidoxima (17%), HI-6

(15,2%) e metoxima (15,3%) conformadas por dois anéis piridínicos apresentaram valores menores de reativação em relação a inibição proveniente da exposição ao clorpirifós. Salienta-se que a capacidade de reativação de uma oxima é considerada satisfatória para a sobrevivência de um organismo intoxicado ao alcançar valores de 10% de reativação perante a inibição ocasionada por qualquer agente inibidor (BAJGAR et al., 2007; KUČA et al., 2018). Todos os resultados obtidos estão resumidos na tabela 3 para melhor visualização.

Basicamente, o mecanismo pelo qual os compostos da classe das oximas exercem sua atividade de reativação da enzima AchE é baseado no ataque nucleofílico exercido sobre o complexo conformado entre o organofosforado e o sítio esterásico da enzima acoplados (WILSON et al., 1992). Entretanto, a capacidade de reativação pode ser influenciada por vários fatores, entre estes salienta-se a afinidade da estrutura molecular da oxima para com a enzima AchE (ČALIĆ et al., 2006), aspecto que pode propiciar ou não um melhor ancoramento entre as estruturas. Entre as características influentes para isso, cita-se o número de piridinas apresentado pelas oximas, o tamanho das pontes de metileno existentes entre oximas compostas por dois anéis piridínicos e o número e posição dos grupos oxima presentes nas piridinas (CABAL; KUČA; KASSA, 2004).

De acordo com os ensaios *in silico* realizados, nenhuma das oximas avaliadas possibilitou a visualização do estabelecimento de interações para com o organofosforado acoplado ao sítio esterásico da enzima. Entretanto, as métricas baseadas na afinidade da estrutura molecular das oximas com os resíduos de aminoácido constituintes do sítio Gorge em conjunto com os parâmetros conformacionais selecionados para cada pose permitiram sugerir os mecanismos moleculares envolvidos com o processo de reativação pelas oximas na enzima AChE fosforilada em *D. melanogaster*. Com base nisso, pode-se visualizar que com exceção à pralidoxima, todas as oximas avaliadas estabeleceram ligações em grande incidência com os mesmos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos constituintes do sítio Gorge Tyr71, Tyr324, Phe371, Tyr73, Tyr370 e Ile327, destacando-se o resíduo Trp321, caracterizado pela função de resíduo chave do sítio periférico na enzima AchE de *D. melanogaster*, demonstrando ser possivelmente em *D. melanogaster*, juntamente com os resíduos anteriores, locais propícios para o estabelecimento de diferentes ligações do tipo π - π e de hidrogênio,

podendo indicar um importante papel no processo de estabilização das estruturas no afunilamento presente no sítio Gorge da AChE de *D. melanogaster*.

Entre os oximas, a que chama maior atenção é a oxima K048, possuindo a menor energia de interação entre as avaliadas, assim como o melhor potencial de reativação da enzima AchE de *D. melanogaster* nas condições *in vitro*. A configuração estrutural assimétrica composta por dois anéis piridínicos contendo apenas um grupo oxima na posição quatro interligados por quatro carbonos possivelmente apresenta as condições mais propícias de afinidade ao afunilamento presente na cavidade constituinte do sítio Gorge da AChE de *D. melanogaster*. A oxima K048 estabelece uma interação hidrofóbica do tipo π -alquil envolvendo um anel piridínico com o resíduo Trp321 e π - π stacking para com o resíduo Tyr71, assim como interações π -alquil envolvendo alguns dos átomos de carbono constituintes da ponte de metileno da oxima K048 para com os resíduos Tyr73 e Trp321. As estruturas maiores, como as apresentadas pelas oximas com duas piridinas, acabam por interagir com maior incidência com os resíduos presentes no sítio Gorge, característica que corrobora para a ancoragem dessas estruturas no afunilamento presente e uma possível dificuldade de fluxo molecular para o ataque nucleofílico. A oxima K048, embora conformada por uma estrutura maior, com dois anéis piridínicos, possui quatro carbonos entre ambos, o que confere para si uma maior extensão. Essa maior extensão possibilitaria que a oxima K048 mesmo quando ancorada aos resíduos presentes no afunilamento anterior ao sítio ativo, obtivesse acesso a Ser238, obtendo êxito no ataque nucleofílico e reativação da enzima.

A pralidoxima apresentou potencial de reativação da acetilcolinesterase de *D. melanogaster* nas condições *in vitro* condizentes ao encontrado para a oxima K048, entretanto, possuindo a maior energia de interação entre as estruturas avaliadas, com apenas uma interação do π - π stacking para com o resíduo Tyr71. Como supracitado, os maiores valores de interação são provavelmente correlacionados ao menor tamanho apresentado por sua estrutura, podendo isso sugerir que os menores números de interações encontrados no seu complexo de ancoragem podem propiciar um melhor deslocamento da pralidoxima no afunilamento presente no sítio Gorge da AChE de *D. melanogaster*, facilitando o fluxo molecular até a porção onde está localizado o sítio ativo da enzima e assim realizar o ataque

nucleofílico na Ser238 fosforilada. Esse tipo de atuação já havia sido sugerida no processo de reativação da enzima AChE de *H. sapiens* para oximas estruturalmente menores, podendo justificar o maior potencial de reativação apresentado para com a enzima AchE de *D. melanogaster* entre as diferentes oximas avaliadas (KUCA et al., 2018).

A trimedoxima apresentou potencial de reativação da enzima AChE de *D. melanogaster* inferior apenas as oximas pralidoxima e K048. Estruturalmente possui conformação ligeiramente inferior à oxima K048, com três carbonos constituintes da ponte de metileno entre os dois anéis piridínicos, assim como uma estrutura simétrica, com a presença de grupos oximas ligados a ambos os anéis piridínicos, com a presença de interações hidrofóbicas do tipo π - π T-shaped para com os resíduos Phe371 e Tyr324 e ligações de hidrogênio para com os resíduos Trp321, Tyr324 e Tyr71. A oxima K027 apresenta estrutura muito semelhante a trimedoxima, com três carbonos constituintes da ponte de metileno entre os dois anéis piridínicos, entretanto, com uma estrutura assimétrica, com a presença do grupo oxima ligado a apenas um dos anéis piridínicos da sua conformação, estabelece ligações π - π stacking com os resíduos Tyr324, Trp321, Tyr73, Phe371 e π alkil com o resíduo Ile327, assim como ligações de hidrogênio para com o resíduo Trp321 e Tyr324. Essa configuração estrutural, entretanto, apresenta potencial de reativação inferior a trimedoxima na AChE de *D. melanogaster*. A presença de um ou dois grupos oxima em ambas as piridinas pode ter resultado na diferença existente na taxa de reativação apresentada entre a trimedoxima e a K027 nos ensaios *in vitro* para a enzima AChE de *D. melanogaster*. Dois grupos oximas poderiam proporcionar a adoção de uma conformação favorável à reativação com maior facilidade para a estrutura da trimedoxima, principalmente pelo menor espaço disponível na AchE de *D. melanogaster* não permitir uma grande variedade de diferentes conformações.

Entre as estruturas avaliadas, possuindo as menores taxas de reativação e maiores valores de interação entre as oximas com duas piridinas estão as oximas obidoxima, HI-6 e metoxima. A obidoxima apresenta uma estrutura simétrica, com a presença de grupos oximas ligados a posição quatro de ambos os anéis piridínicos, assim como a presença de um oxigênio na ponte de metileno interligando ambas as partes. Suas interações para com o sítio Gorge são baseadas em ligações π - π stacking com os resíduos Tyr324, Trp321, Tyr73 e Phe371, além de ligações de

hidrogênio com os resíduos Tyr324 e Trp321. A oxima HI-6, por sua vez, é constituída por uma estrutura assimétrica, contendo apenas um grupo oxima ligado a posição dois de um dos anéis piridínicos de sua constituição, apresentando um átomo de oxigênio na ponte de metileno que interliga os dois anéis piridínicos da sua conformação. Estabelece ligações π - π stacking entre seus anéis piridínicos para com os resíduos Tyr324, Trp321 e Ile327, assim como ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr324 e Tyr71. A oxima HI-6 possui a ligação do grupo oxima em apenas um dos seus dois anéis piridínicos. A grande maioria das poses geradas para essa estrutura posicionou o grupo oxima na face de entrada do sítio Gorge, impossibilitando pela sua grande distância, qualquer tipo de interação que acarrete um processo de reativação. A adoção dessa conformação pode justificar os mecanismos moleculares envolvidos nas menores taxas de reativação vistos *in vitro*. A metoxima apresenta estrutura simétrica, composta por dois anéis piridínicos e grupos oxima ligados a posição quatro de ambas, com apenas um carbono interligando a estrutura. Estabelece ligações π - π stacking com o resíduo Trp321 e Phe371, assim como ligações de hidrogênio para com os resíduos Tyr324 e Tyr370. A sua menor conformação, maior apenas do que o apresentado pela constituição da pralidoxima, não representa, entretanto, um maior potencial de reativação da enzima AChE.

As características apresentadas pelas oximas avaliadas demonstram que a capacidade de reativação da enzima AChE de *D. melanogaster* inibida pelo clorpirifós pode ser influenciada pela afinidade que as estruturas com dois anéis piridínicos possuem com o sítio Gorge, conforme apresentado pela oxima K048, mas que o mesmo não pode ser traduzido para estruturas com dois anéis piridínicos, como a pralidoxima. O maior tamanho na constituição das pontes de metileno pode influenciar nos potenciais de reativação, pois o maior número de carbonos resultou, na maioria das situações em potenciais de reativação, conforme apresentado pela oxima K048 e trimedoxima, não se confirmando para K027. O número de grupos oxima presentes nas estruturas com pontes de metileno em menor tamanho não aparenta influenciar no potencial de reativação das oximas avaliadas, como apresentado pelas oximas HI-6, metoxima e obidoxima, com exceção ao visualizado pelas oximas trimedoxima e K027, que pela constituição intermediária das pontes de

metileno, poderiam acabar conferindo maior taxa de sucesso na reativação da enzima AChE de *D. melanogaster* em condições *in vitro*.

Os pontos supracitados, como o afunilamento presente na porção inicial do sítio Gorge, a porção posterior com uma redução de cerca de 50% no seu volume e as alterações eletrostáticas encontradas na região, podem corroborar para o potencial máximo de reativação encontrado para com a AChE de *D. melanogaster* ser inferior ao visualizado em processos de reativação *in vitro* envolvendo AChE de mamíferos.

Em condições experimentais *in vitro* utilizando-se acetilcolinesterase de *H. sapiens*, as oximas pralidoxima, obidoxima, HI-6 e diferentes oximas da série K, quando administradas em concentrações de 100µM, obtiveram uma capacidade de reativação de 18,2%, 96,9%, 16,1% e valores que variaram de 1,7% a 7%, respectivamente em inibições provocadas pelo organofosforado Paraoxon (KUCA et al., 2018). Em inibições ocasionadas por Tabun, a oxima K048 apresentou um maior potencial de reativação da enzima AChE, superior à apresentada pelas oximas obidoxima, trimedoxima, K027 e HI-6, incapaz de realizar a reativação (KUCA et al., 2007). Diferentes ensaios *in vitro* utilizando-se a acetilcolinesterase de *Rattus* e diferentes compostos organofosforados como o gás XV, tabun e sarin demonstraram que as oximas obidoxima, K027, metoxima, pralidoxima, HI-6 e K048 demonstraram capacidade de reativação variada de acordo com o organofosforado inibindo a enzima. A oxima HI-6 apresentou um maior potencial de reativação do que as oximas K027, obidoxima, metoxima e pralidoxima em inibições ocasionadas pelo gás XV (KUČA; KASSA, 2004). Em inibições ocasionadas pelo tabun, as oximas K027 e K048 quando comparadas, obtiveram ambas bons potenciais de reativação (KUCA et al., 2005), sendo por sua vez, junto com as oximas pralidoxima e obidoxima, inferiores a oxima HI-6, em inibições ocasionadas pelo gás sarin (KUCA et al., 2005b).

A eficácia de reativação das oximas pralidoxima, obidoxima, HI-6 em condições *in vitro* também já havia sido investigada em estudos comparativos envolvendo a enzima AChE de diferentes espécies, como *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Sus domesticus*, *Oryctolagus cuniculus* e *Cavia porcellus* em inibições ocasionadas pelo gás sarin (KUČA; CABAL; KASSA, 2005) e inibições ocasionadas pelo gás XV, sarin e ciclosarin (WOREK et al., 2002). Nestas, demonstrou-se que

existem grandes diferenças no potencial de reativação entre as espécies para os diferentes agentes inibidores empregados, entretanto, que a eficácia na reativação das oximas avaliadas aparenta ser superior nas enzimas AChEs provenientes dos outros animais utilizados em detrimento da enzima AChE humana. A pralidoxima, que apresenta um menor potencial de reativação da enzima AChE inibida por sarin, XV e ciclosarin do que as oximas obidoxima e HI-6 independentemente do organismo avaliado, apresentou um dos maiores potenciais de reativação da enzima AChE de *D. melanogaster* quando inibida pelo clorpirifós. A obidoxima, por sua vez, apresentou bons resultados para inibições provenientes do sarin e XV, e baixos valores de reativação para a enzima inibida pelo ciclosarin, onde a oxima HI-6 obteve melhores resultados de reativação, diferentemente do encontrado em sua utilização para as inibições ocasionadas por sarin ou XV. Em *D. melanogaster*, ambas oximas, obidoxima e HI-6, proporcionaram menores valores de reativação da enzima AChE inibida pelo clorpirifós do que o apresentado pralidoxima.

Os resultados obtidos com *D. melanogaster* quando em comparação com os encontrados em diferentes organismos, corroboram com que o perfil do potencial de reativação apresentado pelas oximas é dependente não só do organofosforado complexado com a enzima AChE como também da afinidade que os mesmos possuem para com a estrutura da enzima AchE das diferentes espécies empregadas, sugerindo que as oximas avaliadas, conforme demonstrado em outros organismos (KUCA et al., 2005; ČALIĆ et al., 2006; BEREND et al., 2008, podem atuar como reativadores da enzima AChE em *D. melanogaster* em condições de inibição por organofosforados, como o clorpirifós em experimentos tanto *in vitro* quanto *In vivo*.

Tabela 3 – **Potencial de reativação das oximas.** Potencial de reativação das diferentes oximas avaliadas perante a inibição da enzima AChE de *D. melanogaster* proveniente da inibição ocasionada pelo organofosforado clorpirifós. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao clorpirifós.

Oxima	Reativação AChE <i>In vitro</i> (%)
Pralidoxima	38,1 \pm 5,01
Trimedoxima	28,3 \pm 6,95
Obidoxima	17 \pm 4,64
Metoxima	15,3 \pm 7,29
HI-6	15,2 \pm 6,64
K027	17,6 \pm 7,73
K048	38,7 \pm 8,34

Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

5.2.2 Atividade antioxidante das oximas *in vitro*

Além da inibição da enzima AChE ocasionada pela exposição ao clorpirifós, existem evidências da indução na produção de espécies reativas de oxigênio em diferentes espécies, quadro que pode levar a indução de estresse oxidativo. A exposição ao clorpirifós ocasionou em alterações da atividade das enzimas CAT, SOD e GST no fígado de tilápias (FARHAN et al., 2021), assim como alterações na atividade das enzimas CAT, GSH, SOD e na indução do aumento dos níveis de peroxidação lipídica (MDA) no cérebro de camundongos (AKPA et al., 2021). Estudos recentes demonstraram ainda que a exposição de *D. melanogaster* a concentrações de 0,75 ppm de clorpirifós acarretaram no aumento de EROs e peroxidação lipídica, aumento na atividade das enzimas GST e nos níveis de GSH, além de um aumento na expressão do fator de transcrição NRF2, responsável pela ativação de respostas antioxidantes (RODRIGUES et al., 2019). As oximas, por sua vez, além da capacidade de reativação da enzima AChE, possuem também a existência de propriedades antioxidantes, variando a sua efetividade de acordo com estrutura da molécula em questão. A capacidade antioxidante das oximas deve-se

aos grupos OH e NH₂ conformantes da sua porção nucleofílica que, através da doação de um próton H⁺ possibilita a atuação desses compostos como potenciais doadores de elétrons, estabilizando a geração de radicais livres. (DE LIMA PORTELLA et al., 2008; PUNTEL et al., 2008, 2009; ÖZEN.; TAŞ, 2009; SUROWIAK; LOCHYŃSKI; STRUB, 2020). Estudos anteriores demonstraram que as oximas K027 e K048 apresentam capacidade de redução da peroxidação lipídica no córtex pré frontal de camundongos (DA SILVA et al., 2008) e que as oximas pralidoxima, obidoxima, trimedoxima e K027 apresentaram capacidade de atenuação de alterações no aumento da atividade das enzimas SOD, aumento dos níveis de peroxidação lipídica (MDA) e aumento de tióis totais no cérebro e plasma de ratos, além de outros marcadores de estresse oxidativo como TOS e TAS (ANTONIJEVIC et al., 2018).

Sendo assim, sabendo-se que os compostos organofosforados, como o clorpirifós, possuem como alvo molecular, além da enzima AChE, a indução de estresse oxidativo e de que, além da conhecida capacidade de reativação da acetilcolinesterase apresentada pelas oximas, essa classe de moléculas demonstra também a existência de propriedades antioxidantes, investigou-se a potencial capacidade das oximas K027, K048, pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6 e metoxima em neutralizar espécies reativas *in vitro*, tais como os radicais livres ABTS e DPPH, ambos mensurados equivalentemente a capacidade antioxidante do ácido ascórbico.

O radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) é utilizado como mensurador de atividade antioxidante de materiais biológicos e isolados, sendo um dos métodos mais frequentemente utilizados como uma primeira abordagem para essa finalidade (GULCIN, 2020). A oxima HI-6 destacou-se por apresentar a maior atividade de sequestro do radical livre DPPH entre as oximas testadas (60,5 ± 11,7%), seguida da oxima da série K, K048, (52,1 ± 0,9%). As oximas Metoxima (48,2 ± 3,7%), Pralidoxima (37,8 ± 4,7%), K027 (24,4 ± 0,9%), Obidoxima (23,3 ± 3,2%) e Trimedoxima (22,2 ± 0,6%), apresentaram atividades de sequestro um pouco menores. Os valores apresentados foram todos mensurados em relação ao ácido ascórbico. Os valores referentes à capacidade antioxidante de cada oxima pelo método DPPH estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4 – **Atividade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico presente nas oximas pelo método DPPH.** Dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao ácido ascórbico (100%).

Oxima	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> (%)
Pralidoxima	37,8 \pm 4,7
Trimedoxima	22,2 \pm 0,6
Obidoxima	23,3 \pm 3,2
Metoxima	48,2 \pm 3,7
HI-6	60,5 \pm 11,7
K027	24,4 \pm 0,9
K048	52,1 \pm 0,9
Ácido ascórbico	100 \pm 0,6

Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Além do método DPPH, a determinação da capacidade antioxidante das oximas K027, K048, pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6 e metoxima, foi mensurada através do método ABTS. O radical 2,2' -azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) apresenta ampla utilização, permitindo análises tanto de compostos lipofílicos quanto hidrofílicos, característica que permite uma boa seletividade das propriedades das amostras de interesse, sendo de modo geral, mais reativo do que o radical DPPH (GULCIN, 2020). As oximas que apresentaram as melhores atividades antioxidantes para o método ABTS em concentrações de 10mM foram, a oxima K048, (61,6 \pm 23%) e a metoxima (59,5 \pm 7,9%), seguidas das oximas K027 (51,2 \pm 8,6%), trimedoxima (14,6 \pm 2,1%) e obidoxima (12,7 \pm 5,4%). As oximas pralidoxima e HI-6 não apresentaram atividade antioxidante através dessa metodologia. Os valores apresentados foram todos mensurados em relação ao ácido ascórbico. Os valores referentes à capacidade antioxidante de cada oxima pelo método ABTS estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5 – **Atividade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico presente nas oximas pelo método ABTS.** Dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao ácido ascórbico (100%).

Oxima	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> (%)
Pralidoxima	nd
Trimedoxima	14,6 \pm 2,1
Obidoxima	12,7 \pm 5,4
Metoxima	59,5 \pm 7,9
HI-6	nd
K027	51,2 \pm 8,6
K048	61,6 \pm 23
Ácido ascórbico	100 \pm 12

Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

As melhores atividades antioxidantes foram apresentadas pela oximas Metoxima, com uma porcentagem de inibição do DPPH de 48,2 \pm 3,7 e de inibição do ABTS de 59,5 \pm 7,9 e K048, com uma porcentagem de inibição do DPPH de 52,1 \pm 0,9 e de inibição do ABTS de 61,6 \pm 23.

As oximas K027, K048, pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6 e metoxima, embora eficazes em realizar a reativação *in vitro* da enzima acetilcolinesterase de maneira satisfatória em *D. melanogaster* quando expostas a inibição pelo clorpirifós, apresentaram discreta atividade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, não superando a atividade antioxidante apresentada pelo ácido ascórbico. Embora a indução do estresse oxidativo seja relatada como uma importante via de toxicidade dos compostos organofosforados, a correlação entre o potencial de reativação da acetilcolinesterase pelas oximas e suas atividades antioxidantes foi inexistente nas condições propostas, com $r = 0,540937$ ($p > 0,05$).

Em suma, o organismo modelo *D. melanogaster* demonstrou ser uma ferramenta eficiente para triagem de novos compostos reativadores de acetilcolinesterase *in vitro*, permitindo a possibilidade de obtenção de taxas de reativação consideradas satisfatórias para a sobrevivência de um organismo. A presente abordagem possibilitou ainda a constatação da maior eficácia de reativação das oximas K048 < pralidoxima em detrimento das oximas trimedoxima < K027 < obidoxima < metoxima < HI-6. Pode-se também visualizar a discreta atividade antioxidante apresentada pelas oximas avaliadas. Apesar de as abordagens *in vitro* refletirem, muitas vezes, em resultados semelhantes aos encontrados em ensaios utilizando organismos vivos, em determinadas condições são apenas sugestivos e não necessariamente refletem a complexidade da interação entre droga-enzima-espécie e o cenário real da dinâmica molecular *in vivo* (ANDRADE et al., 2016). Com base nisso, torna-se pertinente a complementação dos resultados advindos da abordagem *in silico* para com ensaios pertencentes a abordagem *in vivo* para verificação da efetividade das oximas para com espécimes de *D. melanogaster* expostos ao clorpirifós.

5.3 Abordagem *in vivo*

5.3.1 Efeito das oximas sobre a atividade da enzima AChE *in vivo*

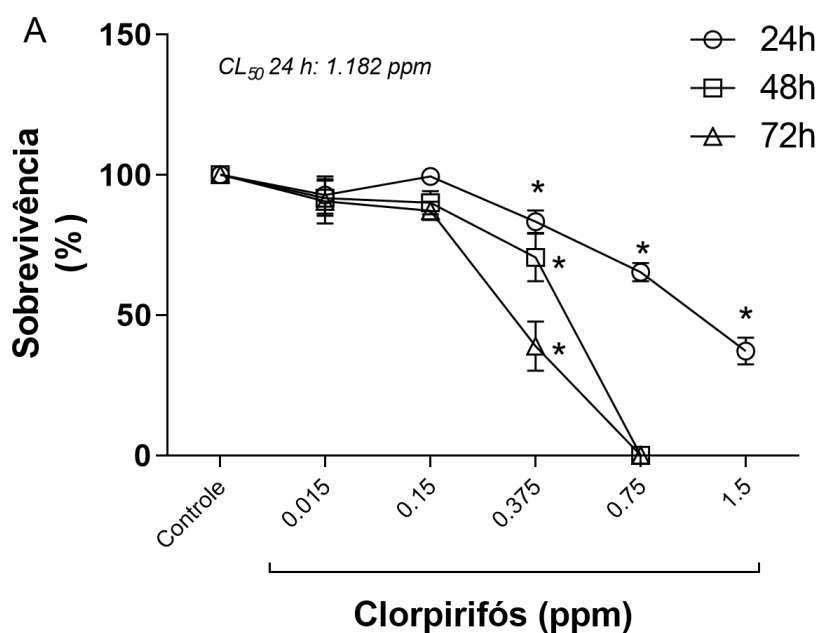
O intensivo emprego do organofosforado clorpirifós resulta, em muitas ocasiões, na contaminação de diversos ecossistemas, como solos, sedimentos, água e ar. Além da presença nos ecossistemas citados, resquícios de sua utilização podem ser encontrados em vegetais e alimentos de origem animal, possibilitando em decorrência de sua ingestão, na detecção de traços da sua constituição em diferentes fluídos humanos, como leite materno, urina e sangue (DAR; KAUSHIK; VILLARREAL-CHIU, 2019; HUANG; CUI; DUAN, 2020). Estudos anteriores realizados na Índia demonstram que dentre diversas amostras analisadas provenientes de alimentos de origem animal, o clorpirifós foi o único dentre diversos organofosforados investigados a estar presente acima do limite máximo de resíduos de pesticidas legalmente tolerados em alimentos (MRL - *Maximum Residue Limit*) (KUMARI et al., 2005), além de 80% de diferentes amostras de água analisadas detectarem sua presença acima dos limites permitidos (KUMARI; MADAN; KATHPAL, 2007). Essa grande variedade de possíveis fontes de exposição ao clorpirifós, acidentais ou não, permite com que animais e humanos, através de vias

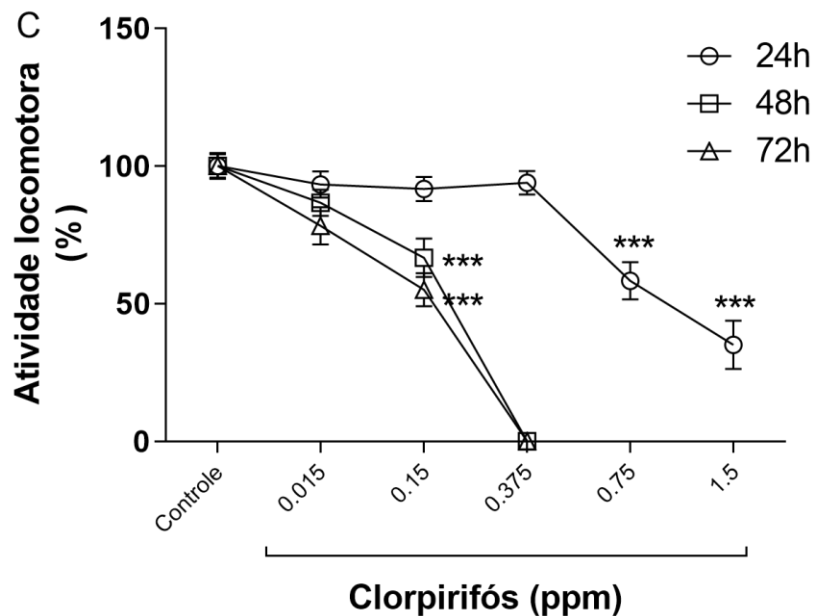
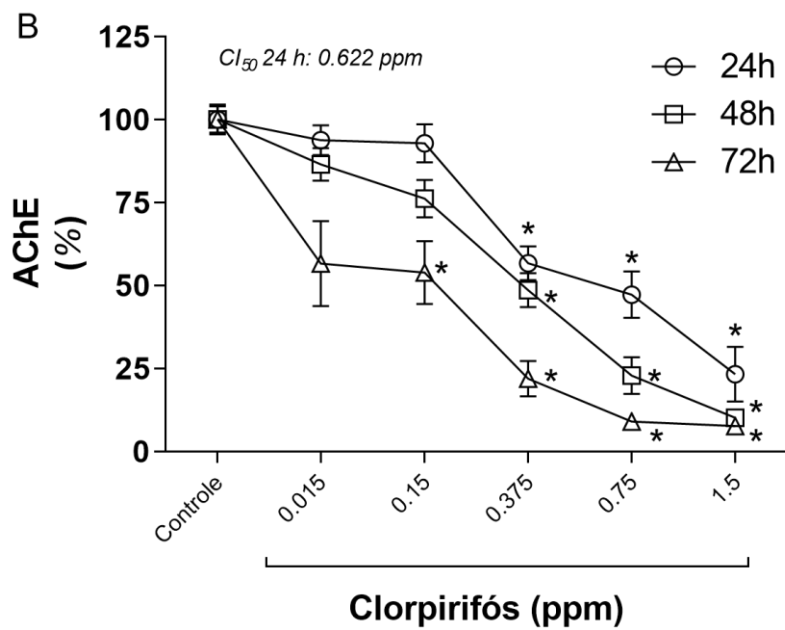
orais, dermais ou inalatórias, desenvolvam desordens relacionadas aos mecanismos de toxicidade pertinentes aos organofosforados, como a inibição da enzima AChE (DAR; KAUSHIK; VILLARREAL-CHIU, 2019; HUANG; CUI; DUAN, 2020). Diferentes animais, como *Gallus* expostos a administração oral por clorpirifós apresentaram, duas horas após ingestão, uma diminuição na sua atividade locomotora (AL-BADRANY; MOHAMMAD, 2007). Peixes expostos ao mesmo composto apresentaram perda de equilíbrio e menores atividades locomotoras (MISHRA; GOPESH; SINGH, 2020). Estudos envolvendo girinos demonstraram que a exposição ao clorpirifós acarretou em alterações locomotoras, traduzidas no padrão de nado apresentado pelos animais e morte em decorrência da inibição da enzima AChE (SALGADO COSTA et al., 2018). Como supracitado, os tratamentos direcionados a casos de intoxicação são baseados, além da utilização de agentes antimuscarínicos, na administração de oximas que, embora amplamente utilizadas, não possuem efetividade para todos os agentes inibitórios existentes (WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016). Aliado a isso, sabe-se que abordagens *in vitro*, embora representem uma etapa inicial importante para obtenção de informações relacionadas a resposta de um sistema, nem sempre podem representar a complexidade existente em um modelo biológico, necessitando do emprego de abordagens *in vivo* para confirmação do potencial encontrado em ensaios *in vitro*. (ANDRADE et al., 2016).

Sendo assim, com base nos resultados advindos das abordagens *in silico* e *in vitro*, como a afinidade das oximas para com o sítio Gorge da enzima AchE de *D. melanogaster* e a capacidade de reativação *in vitro* da enzima AchE inibida pelo clorpirifós, assim como o conhecimento de que entre os sinais clássicos advindos da intoxicação por organofosforados em mamíferos encontram-se sintomas correlatos a síndrome colinérgica como alterações no comportamento locomotor e morte (NOSTRANDT; PADILLA; MOSER, 1997), investigou-se a concentração de clorpirifós efetiva em causar a mortalidade de 50% da população de *D. melanogaster*, bem como o efeito protetor das oximas sobre os padrões de sobrevivência, âmbito locomotor e atividade da enzima AChE nesses organismos. Para os ensaios relacionados à proteção optou-se pela utilização das oximas que obtiveram os melhores resultados de reativação da enzima AchE na abordagem *in vitro*, pralidoxima e K048.

Para isso, espécimes de *D. melanogaster* foram expostos a diferentes concentrações de clorpirifós por um período de 24 horas. A concentração efetiva em ocasionar a mortalidade de 50% da população tratada foi de 1,182 ppm de clorpirifós. A partir desse resultado, a concentração de 0,75 ppm, responsável por ocasionar forte inibição da enzima AChE de *D. melanogaster* e significativa diminuição na sua atividade locomotora, foi atribuída como opção de escolha para os ensaios posteriores de proteção com as oximas. Os resultados são demonstrados na figura 19 para melhor visualização.

Figura 21 – **Clorpirifós e os padrões de sobrevivência, atividade da enzima AChE e atividade locomotora de *D. melanogaster*.** Efeito dos tratamentos com o organofosforado clorpirifós sobre os padrões de sobrevivência (A), atividade da enzima AChE (B) e atividade locomotora de *D. melanogaster* (C). Dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.



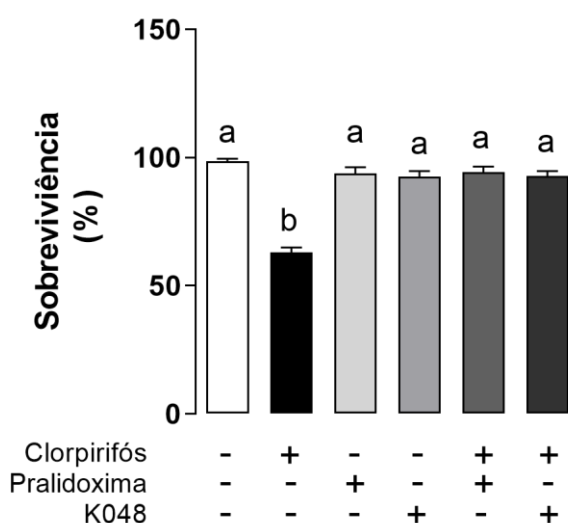


Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Os espécimes de *D. melanogaster* foram então expostos na presença de 0,75 ppm de clorpirifós, além das oximas pralidoxima ou K048 na concentração de 1,5 ppm por um período de 24 horas. A concentração de 1,5 ppm de cada oxima foi atribuída como opção de escolha por permitir a possibilidade de saturação das condições do ensaio para verificação do potencial deslocamento da porção fosforil

do organofosforado presente na Ser238 do sítio ativo da enzima AChE de *D. melanogaster* pelas oximas administradas.

Figura 22 – **Clorpirifós e as oximas sobre a sobrevivência de *D. melanogaster*.** Efeito dos tratamentos com o organofosforado clorpirifós e com as oximas pralidoxima e K048 sobre a sobrevivência de *D. melanogaster*. Dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). Valores que diferem nas letras foram considerados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

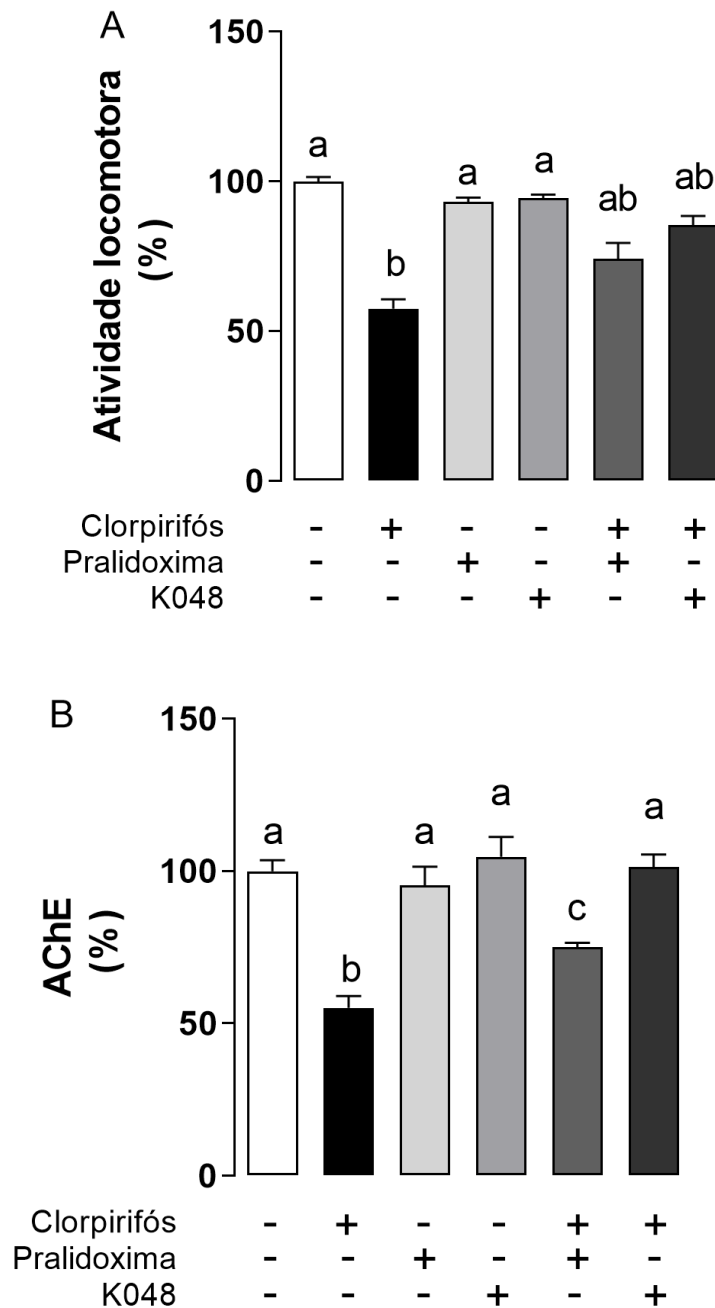
A administração do organofosforado clorpirifós na concentração de 0,75 ppm induziu significativamente a mortalidade de *D. melanogaster*. As oximas pralidoxima ou K048, quando administradas de maneira isolada na concentração de 1,5 ppm, não influenciaram a taxa de mortalidade de *D. melanogaster* quando em comparação ao grupo controle, entretanto, quando administradas em conjunto ao clorpirifós, reverteram a morte induzida pelo organofosforado, restabelecendo-os em nível de controle. Todos os resultados obtidos estão demonstrados na figura 20 para melhor visualização.

Com base nisso, os ensaios de atividade locomotora foram então realizados com os espécimes de *D. melanogaster* sobreviventes ao período de 24 horas de exposição ao clorpirifós na concentração de 0,75 ppm e/ou uma das oximas, pralidoxima e K048 nas concentrações de 1,5 ppm. A atividade locomotora foi mensurada através do ensaio de geotaxia negativa, método que avalia a capacidade

dos indivíduos de se dirigirem contra a gravidade, tendência comportamental de *D. melanogaster*. Os organismos expostos ao clorpirifós na concentração de 0,75 ppm apresentaram significativo decréscimo no número de indivíduos presentes na porção final do tubo em relação ao grupo controle. Os organismos expostos às oximas pralidoxima e K048 isoladamente não apresentaram alterações no número de indivíduos na porção superior do tubo quando em comparação com o grupo controle. Os organismos expostos ao clorpirifós quando em conjunto com as oximas pralidoxima e K048 apresentaram aparente reversão na atividade locomotora, entretanto, em nível intermediário em relação ao grupo controle e ao grupo exposto ao clorpirifós. Todos os resultados obtidos estão demonstrados na figura 21 para melhor visualização.

Por fim, posterior aos ensaios de atividade locomotora, foram conduzidos os ensaios visando mensurar a ação das oximas pralidoxima e K048 perante a inibição da enzima AChE de *D. melanogaster* ocasionada pela exposição ao clorpirifós *in vivo*. Os ensaios foram realizados com os espécimes de *D. melanogaster* sobreviventes pelo período de 24 horas de tratamento. A atividade da enzima AChE dos organismos pertencentes ao grupo controle foi utilizada como 100% para os ensaios conseguintes. Os organismos expostos ao clorpirifós na concentração de 0,75 ppm apresentaram significativo decréscimo na atividade da enzima AChE. Os organismos expostos às oximas pralidoxima e K048 não apresentaram decréscimo da atividade da enzima AChE quando em comparação ao grupo controle. Os organismos expostos ao clorpirifós quando em conjunto com as oximas pralidoxima ou K048 apresentaram reativação na inibição causada pelo organofosforado, destacando-se a oxima K048, capaz de realizar a reativação da enzima AChE ao nível de controle.

Figura 23 – Clorpirifós e as oximas sobre a atividade locomotora e a atividade da enzima acetilcolinesterase de *D. melanogaster*. Efeito dos tratamentos com o organofosforado clorpirifós e com as oximas pralidoxima e K048 sobre a atividade locomotora de *D. melanogaster* (A) e sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase de *D. melanogaster* (B). Dados são expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (100%). Valores que diferem nas letras foram considerados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).



Fonte: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para triagem de compostos reativadores de acetilcolinesterase. Pablo Macedo, 2021.

Com base nos ensaios realizados, pode-se observar que a administração de clorpirifós em uma concentração de 0,75 ppm em *D. melanogaster*, por um período de 24 horas foi capaz de causar alterações em seus parâmetros locomotores e inibição da atividade da enzima AChE. Alterações no âmbito locomotor em exposições ao clorpirifós são bem evidenciadas na literatura, afetando organismos de diferentes espécies, sendo fundamentais para a sobrevivência dos organismos no ambiente (AL-BADRANY; MOHAMMAD, 2007; SALGADO COSTA et al., 2018; MISHRA; GOPESH; SINGH, 2020; SILVA, 2020; DISNER et al., 2021; UBAID UR RAHMAN et al., 2021).

A inibição da atividade da enzima AchE interfere no seu sistema catalítico, impedindo a hidrólise da acetilcolina, acarretando no seu consequente aumento na fenda sináptica (RAHMAN et al., 2021). O aumento da acetilcolina na fenda sináptica leva aos sintomas da síndrome colinérgica que podem ser traduzidos como as alterações no âmbito locomotor apresentadas pelos espécimes de *D. melanogaster* expostos ao clorpirifós.

A oxima K048 apresentou o melhor desempenho protetor frente a inibição ocasionada pela exposição ao clorpirifós, restabelecendo a atividade da enzima AchE ao nível de controle, além de propiciar a restauração parcial da atividade locomotora de *D. melanogaster*. A K048 apresentou ainda a menor energia de interação entre as estruturas avaliadas na abordagem *in silico*, assim como a melhor taxa de reativação da enzima AchE *in vitro*. Esses resultados, quando em conjunto, sugerem que a estrutura assimétrica composta por dois anéis piridínicos contendo apenas um grupo oxima na posição quatro interligados por quatro carbonos apresenta a maior efetividade para reativação e proteção da enzima AchE de *D. melanogaster* inibida pelo clorpirifós dentre as oximas avaliadas.

A pralidoxima, assim como a K048, apresentou atividade protetora frente a inibição ocasionada pela exposição ao clorpirifós, restabelecendo a atividade da enzima AchE em relação ao grupo exposto a somente o clorpirifós, entretanto não a nível de controle, característica que propiciou a restauração parcial da atividade locomotora de *D. melanogaster*. A pralidoxima apresentou a maior energia de interação entre as oximas avaliadas na abordagem *in silico*, esses valores, entretanto não refletem a taxa de reativação da enzima AchE *in vitro* apresentada, com 38%. Esses resultados, quando em conjunto, corroboram com a sugestão de

que a estrutura molecular apresentada pela pralidoxima, com um anel piridínico e um grupo oxima na posição quatro, embora significativamente menor que a estrutura apresentada pela oxima K048, apresenta efetividade para reativação e proteção da enzima AchE de *D. melanogaster*, entretanto, de maneira menos eficiente do que a K048 *in vivo*.

A proteção ocasionada pelas oximas pralidoxima e K048 nos ensaios *in vivo* em *D. melanogaster* confirma o potencial de reativação encontrado nos ensaios *in vitro*, podendo ser decorrente da ação sinérgica entre o ataque nucleofílico para com o sítio ativo em um período de tempo de administração das oximas após a exposição do clorpirifós que não permitiu a ocorrência do envelhecimento do complexo organofosforado enzima AChE, assim como da ligação reversível com a enzima AChE que esses compostos apresentam, explicando assim a maior atividade da enzima AChE em comparação ao visualizado nos ensaios *in vitro*. Oximas com um ou dois anéis piridínicos como a pralidoxima e a K048, podem atuar protegendo contra a fosforilação ocasionada pelos organofosforados através da sua ligação reversível com a enzima AChE. A oxima então ligada a enzima interfere em uma possível conformação entre a enzima AChE e os organofosforados, podendo essas ligações serem conformadas para com a tríade catalítica, com o sítio periférico ou com ambos, impedindo sua inibição por um composto organofosforado (ČALIĆ et al., 2006; BEREND et al., 2008). É importante salientar que as oximas avaliadas na concentração em que foram administradas, mesmo ligando-se reversivelmente, não inibiram significativamente a atividade da enzima AChE, nem foram capazes de ocasionar em alterações no âmbito locomotor, demonstrando a baixa toxicidade e segurança da administração nas doses empregadas.

O maior potencial de proteção encontrado para a oxima K048 em relação a pralidoxima pode ser decorrente da afinidade existente entre as estruturas, conforme visualizado nos ensaios *in silico*, pois a estrutura da oxima possuidora da maior afinidade para com a enzima pode representar a melhor ação protetora contra diferentes compostos organofosforados (ČALIĆ et al., 2006), assim como do estabelecimento de ligações com o resíduo Tyr371, caracterizado por ser o resíduo chave do sítio periférico na enzima AchE de *D. melanogaster*. Na enzima AchE de *H. sapiens*, ligantes que estabelecem interações com o sítio periférico podem diminuir a taxa com que outros ligantes acessam o sítio esterásico, através da diminuição do

fluxo molecular pela cavidade do sítio Gorge (MALLENDER; SZEGLETES; ROSENBERRY, 2000). A pralidoxima, incapaz dessa interação nos ensaios *in silico* realizados acaba apresentando menor potencial protetor. O efeito protetor apresentado pelas oximas pralidoxima e K048 em *D. melanogaster* exposta ao clorpirifós representa um importante parâmetro a ser avaliado em uma oxima, pois possibilita o desenvolvimento de possíveis estruturas que possam atuar concomitante a um processo de reativação muito lento ou um envelhecimento muito acelerado (ČALIĆ et al., 2006; BEREND et al., 2008), demonstrando a possibilidade do emprego desse organismo como modelo inicial para triagem de novos compostos tanto com potencial protetor como aqueles com potencial de pré tratamento como prevenção a intoxicações em cenários de risco, como cenários de guerra (LORKE; PETROIANU, 2019).

Embora a administração das oximas pralidoxima e K048 tenha sido eficiente em proteger a atividade da enzima AChE da inibição ocasionada pelo clorpirifós e aumentar a taxa de sobrevivência, não foram capazes de realizar a reabilitação da atividade locomotora de *D. melanogaster*, demonstrando que o clorpirifós pode possuir outros alvos moleculares não diretamente envolvidos com a enzima AChE. De fato, compostos organofosforados podem ocasionar diversas alterações no SNC dos organismos expostos, onde mesmo estratégias contemplando a utilização de pré tratamentos conformados por oximas em conjunto com agentes antimuscarínicos, capazes de melhorar significativamente a taxa de sobrevivência, são aptos a evitar sequelas relacionadas a convulsões e alterações comportamentais (WEISSMAN; RAVEH, 2008).

Existem poucos estudos *in vivo* realizados envolvendo a avaliação de oximas quando em comparação com aqueles realizados *in vitro*. Entretanto, o potencial de proteção e reativação da enzima AChE pelas oximas K048 e pralidoxima já havia sido demonstrado em vários estudos *in vivo* envolvendo ratos e camundongos expostos aos compostos organofosforados tabun, malation e paraoxon (KASSA et al., 2006; KASSA, 2006; ČALIĆ et al., 2006; LUCIĆ VRDOLJAK et al., 2006; BEREND et al., 2008; NURULAIN et al., 2009; DA SILVA et al, 2008; GUPTA et al., 2014; ŽUNEC et al., 2015). Dentre estes, quando comparadas, a oxima K048 combinada com o anticolinérgico benactizina, apresentou maior eficácia do que a pralidoxima em camundongos expostos a morte induzida pelo organofosforado

tabun (KASSA, 2006), assim como em ratos expostos a morte induzida pelo organofosforado paraoxon (PETROIANU et al., 2006; PETROIANU et al., 2007; PETROIANU et al., 2007b; NURULAIN et al., 2009) e ratos expostos a morte pelo organofosforado diisopropilfluorofosfato (DFP) (LORKE et al., 2008; LORKE et al., 2009), sendo inefetivas frente à inibição da AChE ocasionada pelo organofosforado sarin e soman nesses mesmos organismos (KUCA; CABAL; KASSA, 2005; ČALIĆ et al., 2006). Todos esses estudos variam de acordo com as espécies, o período de tempo de administração das oximas após exposição ao organofosforado e o tipo desse composto. Em *D. melanogaster* em exposições ao clorpirifós e administração concomitante das oximas K048 e pralidoxima, obtivemos uma maior eficácia de proteção para a oxima K048 em detrimento da oxima pralidoxima, sem a administração de um agente anticolinérgico em conjunto.

Embora efetivas na maioria das situações supracitadas, a utilização dos compostos da classe das oximas continua controverso (JOHNSON et al., 2000b; EYER., 2003; LORKE et al., 2008; EDDLESTON et al., 2008; WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016), levando a tentativas de desenvolvimento de compostos que possuam efetividade frente a um maior número de compostos organofosforados e melhor penetração a barreira hematoencefálica e consequente acesso ao SNC (SAKURADA; OHTA, 2020), pois independentemente de as oximas pralidoxima e K048 terem apresentado bons potenciais em *D. melanogaster* e outros organismos nas abordagens *in vitro* e *in vivo*, o perfil da reativação apresentado por elas e outros compostos pertencentes à mesma classe podem ser influenciados por diversos fatores como a estrutura apresentada pelos diferentes compostos organofosforados, a toxicidade apresentada pela oxima, a conformação da acetilcolinesterase do organismo exposto, o período de tempo que a oxima foi administrada após a exposição ao organofosforado e o próprio acesso das oximas ao SNC (WOREK et al., 2002; WOREK; THIERMANN; WILLE, 2016). Contudo, a determinação dos diferentes efeitos da administração das oximas pralidoxima e K048 de maneira aproximada em diferentes espécies, como em camundongos e *D. melanogaster*, podem gerar relevantes informações sobre a eficácia e ocorrência de respostas semelhantes em outras espécies, como *H. sapiens*.

Em suma, o organismo modelo *D. melanogaster* demonstrou ser uma ferramenta eficiente para triagem de novos compostos reativadores de

acetilcolinesterase *in vivo*, permitindo o estabelecimento e avaliações tanto de manifestações comportamentais correlatas a síndrome colinérgica apresentada em mamíferos intoxicados por compostos organofosforados quanto bioquímicos, como a inibição e reativação da atividade da enzima AChE. A presente abordagem possibilitou ainda a constatação da maior eficácia da oxima K048 em detrimento da pralidoxima na proteção contra intoxicações pelo organofosforado clorpirifós em *D. melanogaster*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstram que dentre os principais resultados obtidos, tem-se:

- ❖ A obtenção dos possíveis resíduos de aminoácidos importantes para o processo de reativação da enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster* complexada ao clorpirifós.
- ❖ A constatação da inibição da enzima acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster* pelo clorpirifós *in vitro*.
- ❖ A constatação do potencial de reativação da acetilcolinesterase inibida pelo clorpirifós pelas oximas K027, K048, pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6 e metoxima em *Drosophila melanogaster in vitro*.
- ❖ A constatação do potencial antioxidante das oximas K027, K048, pralidoxima, trimedoxima, obidoxima, HI-6 e metoxima *in vitro*.
- ❖ A constatação do aumento na mortalidade, alterações locomotoras e inibição da enzima acetilcolinesterase pelo clorpirifós em *Drosophila melanogaster*.
- ❖ A constatação do potencial de reversão conferido pelas oximas pralidoxima e K048 perante o aumento na mortalidade, alterações locomotoras e inibição da enzima acetilcolinesterase ocasionadas pelo clorpirifós em *Drosophila melanogaster*.

Sendo assim, de modo geral, o organismo modelo *Drosophila melanogaster*, devido à taxa de reativação alcançada pelas oximas avaliadas e em virtude da possibilidade do estabelecimento de manifestações correlatas à síndrome colinérgica pela exposição ao clorpirifós, seguida da conseguinte proteção ocasionada pelas oximas, demonstra ser uma importante alternativa para investigação de novos compostos reativadores de acetilcolinesterase tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A elucidação dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos no processo de reativação da enzima acetilcolinesterase permite ainda traçar quais os resíduos de aminoácidos mais importantes para esse fim. Posto isso, os resultados, quando em conjunto, demonstram que *Drosophila melanogaster* pode ser empregada como um potencial modelo para investigação e triagem inicial de novos compostos reativadores de acetilcolinesterase em inibições ocasionadas pelo clorpirifós ou outros compostos organofosforados *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, J.; PUNCHARD, N, A.; TAYLOR, J. A.; THOMPSON, R. P. H.; PEARSON, T. C. **Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency**. *European Journal Haematology*. v. 47, n. 4, p. 287-291, 1991.
- AKPA, R. et. al. **Protective effect of fisetin against subchronic chlorpyrifos-induced toxicity on oxidative stress biomarkers and neurobehavioral parameters in adult male albino mice**. *Toxicological Research*. v. 37, n. 2, p. 163–171, 2021.
- AL-BADRANY, Y. M. A.; MOHAMMAD, F. K. **Effects of acute and repeated oral exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos on open-field activity in chicks**. *Toxicology Letters*. v. 174, n. 1–3, p. 110–116, 2007.
- ALLEN, R. G. **Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation**. *Age*. v. 21, p. 47–76, 1998.
- ANANTHAN, R.; BASKAR, C.; NARMATHABAI, V.; PARI, L.; LATHA, M.; RAMKUMAR, K. M. **Antidiabetic effect of *Gymnema montanum* leaves: effect on lipid peroxidation induced oxidative stress in experimental diabetes**. *Pharmacological Research*. v. 48, p. 551-556, 2003.
- ANDRADE, E. L. et al. **Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49, n. 11, p. e5644, 2016
- ANTONIJEVIC, Evica et al. **Effect of six oximes on acutely anticholinesterase inhibitor-induced oxidative stress in rat plasma and brain**. *Archives of Toxicology*. v. 92, n. 2, p. 745–757, 2018.
- BAJGAR, J. et al. **Treatment of Organophosphate Intoxication Using Cholinesterase Reactivators:Facts and Fiction**. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. v. 7, n. 5, p. 461–466, 2007.
- BALTRUŠAITYTĖ, V.; VENSKUTONIS, P. R.; ČEKSTERYTĖ, V. **Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts**. *Food Chemistry*. v. 101, n. 2, p. 502–514, 2007.
- BENFENATI, E. et al. **Comparing In Vivo , In Vitro and In Silico Methods and Integrated Strategies for Chemical Assessment: Problems and Prospects**. *Alternatives to Laboratory Animals*, v. 38, n. 2, p. 153–166, maio 2010.
- BEREND, S. et al. **In vivo experimental approach to treatment against tabun poisoning**. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. v. 25, n. 4, p. 531–536, 2010.
- BEREND, S. et al. **New bispyridinium oximes: In vitro and in vivo evaluation of their biological efficiency in soman and tabun poisoning**. *Chemico-Biological Interactions*. v. 175, n. 1–3, p. 413–416, 2008.
- BIESALSKI, H. K. **Free radical theory of aging**. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. v. 5, n. 1, p. 5-10, 2002.

BIRBEN, E. et al. **Oxidative Stress and Antioxidant Defense**. World Allergy Organization Journal. v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry. v. 72, p. 248–254, 1976.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. 2018. – v. 1. t. 2. Modo de acesso: World Wide Web: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf>

CABAL, J; KUČA, K.; KASSA, J. **Specification of the Structure of Oximes Able to Reactivate Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase**. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. v. 95, n. 2, p. 81–86, 2004.

ČALIĆ, M. et al. **In vitro and in vivo evaluation of pyridinium oximes: Mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity**. Toxicology. v. 219, n. 1–3, p. 85–96, 2006.

CAVALCANTI, L. P. A. N.; AGUIAR, A. P.; LIMA, J. A.; LIMA, A. L. S. **Intoxicação por organofosforados: Tratamento e metodologias analíticas empregadas na avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase**. Revista Virtual Química. v. 8, n. 3, p. 739-766, 2016.

COSTA, L. G. **Current issues in organophosphate toxicology**. Clinica Chimica Acta. International Journal of Clinical Chemistry. v. 366, n. 1–2, p. 1–13, 2006.

COUSIAS, E. A.; WESTER, M. J. RMSD and Symmetry. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 40, n. 15, p. 1496–1508, 2019.

ĆUPIĆ, D.; BOROZAN, S.; IVANOVIĆ, S. **Involvement of cholinesterases in oxidative stress induced by chlorpyrifos in the brain of Japanese quail**. Poultry Science. v. 97, n. 5, p. 1564–1571, 2018.

DA SILVA, F. D. et al. **Molecular docking analysis of acetylcholinesterase corroborates the protective effect of pralidoxime against chlorpyrifos-induced behavioral and neurochemical impairments in Nauphoeta cinerea**. Computational Toxicology. v. 8, p. 25–33, 2018.

DA SILVA, N. A. **Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós por fungos de origem marinha**. Orientador: André Luiz Meleiro Porto. 2013. 161 p. Dissertação (Instituto de Química de São Carlos). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-30072013-091823/publico/NataliaAlvarenga_daSilva_Revisado.pdf. Acesso em: 08 jul. 2021.

DA SILVA, P. et al. **Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex**. NeuroToxicology. v. 29, n. 1, p. 184–189, 2008.

DAR, M. A.; KAUSHIK, G.; VILLARREAL-CHIU, J. F. **Pollution status and bioremediation of chlorpyrifos in environmental matrices by the application of bacterial communities: A review.** *Journal of Environmental Management*. v. 239, p. 124–136, 2019.

Dassault Systèmes BIOVIA, **Discovery Studio Modeling Environment**, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2017.

DE CASTRO, A. et al. **Understanding the Interaction Modes and Reactivity of Trimedoxime toward MmAChE Inhibited by Nerve Agents: Theoretical and Experimental Aspects.** *International Journal of Molecular Sciences*. v. 21, n. 18, p. 6510, 2020.

DE LIMA PORTELLA, R. et al. **Oximes as inhibitors of low density lipoprotein oxidation.** *Life Sciences*. v. 83, n. 25–26, p. 878–885, 2008.

DISNER, G. R. et al. **The Toxic Effects of Glyphosate, Chlorpyrifos, Abamectin, and 2,4-D on Animal Models: A Systematic Review of Brazilian Studies.** *Integrated Environmental Assessment and Management*. v. 17, n. 3, p. 507–520, 2021.

EATON, D. L.; DAROFF, R.B., AUTRUP, H.; BRIDGES, J.; BUFFLER, P.; COSTA, L.G.; COYLE, J.; McKHANN, G.; MOBLEY, W.C.; NADEL, L.; NEUBERT, D.; SCHULTE-HERMANN, R.; SPENCER, P.S. **Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment.** *Critical Reviews in Toxicology*. v. 38, n. s2, p. 1-125, 2008.

EDDLESTON, M. et al. **Management of acute organophosphorus pesticide poisoning.** *The Lancet*. v. 371, n. 9612, p. 597–607, 2008.

ELHANANY, E. et al. **Resolving Pathways of Interaction of Covalent Inhibitors with the Active Site of Acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS Analysis of Various Nerve Agent Phosphyl Adducts.** *Chemical Research in Toxicology*. v. 14, n. 7, p. 912–918, 2001.

ELLMAN, G.L.; LOURTNEY, D. K.; ANDRES, V.; GMELIN, G. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical Pharmacology*. v. 7, p. 88–95, 1961.

EM MAIO, IBGE PREVÊ SAFRA DE 262,8 MILHÕES DE TONELADAS PARA 2021. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/30916-em-maio-ibge-preve-safra-de-262-8-milhoes-de-toneladas-para-2021>. Acesso em: 2 set. 2021.

ESTEVAN, C.; VILANOVA, E.; SOGORB, M. A. **Chlorpyrifos and its metabolites alter gene expression at non-cytotoxic concentrations in D3 mouse embryonic stem cells under in vitro differentiation: Considerations for embryotoxic risk assessment.** *Toxicology Letters*. v. 217, n. 1, p. 14-22, 2013.

EYER, P. **The Role of Oximes in the Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning.** *Toxicological Reviews*. v. 22, n. 3, p. 165–190, 2003.

FARHAN, M. et al. **Investigation of oxidative stress enzymes and histological alterations in tilapia exposed to chlorpyrifos.** *Environmental Science and Pollution Research*. v. 28, n. 11, p. 13105–13111, 2021.

- FOURNIER, D.; MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J. M. **Drosophila acetylcholinesterase: Mechanisms of resistance to organophosphates**. *Chemico-Biological Interactions*. v 87, p. 233–238, 1993.
- GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D.; THOMAS, H. Wills': **biochemical basis of medicine**. 3. ed, Oxford: Butterworths Scientific, 1997.
- GIORDANO, G.; AFSHARINEJAD, Z.; GUIZZETTI, M.; VITALONE, A.; KAVANAGH, T. J.; COSTA, L.G. **Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency**. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 219, p. 181–189, 2007.
- GOEL, A.; DANI, V.; DHAWAN, D. K. **Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity**. *Chemico-Biological Interactions*. v. 156, p. 131–140, 2005.
- GOHLKE, H; KLEBE, G. **Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors**. *Angewandte Chemie-International Edition*. v. 41, p 2644–2676, 2002.
- GONÇALVES, A. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos**. 207 p, Tese (Doutorado em Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- GONÇALVES, A. S.; FRANÇA, T. C. C.; WILTER, A.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Molecular Dynamics of the Interaction of pralidoxime and deazapralidoxime with acetylcholinesterase inhibited by the neurotoxic agent tabun**. *Jornal of the brazilian chemical society*, v.17, p. 968-975, 2006.
- GULCIN, İ. **Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview**. *Archives of Toxicology*. v. 94, n. 3, p. 651–715, 2020.
- GUPTA, et al. **In vitro reactivation kinetics of paraoxon- and DFP-inhibited electric eel AChE using mono- and bis-pyridinium oximes**. *Archives of Toxicology*. v. 88, n. 2, p. 381–390, 2014.
- HALGREN, T. **Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules**. *J. Comput. Chem*, 1996.
- HALLIWELL, B. **Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence?**. *The Lancet*. v. 344, p. 721-724, 1994.
- HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCHD, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON G. R. **Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform**. *Journal of Cheminformatics*. v. 4, p. 1-17, 2012.
- HAREL, M.; KRYGER, G.; ROSENBERRY, T. L.; MALLENDER, W. D.; LEWIS, T.; FLETCHER, R. J.; GUSS, J. M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. **Three-dimensional structures of Drosophila melanogaster acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors**. *Protein Science*. v. 9, p. 1063–1072, 2000.
- HUANG, X; CUI, H; DUAN, W. **Ecotoxicity of chlorpyrifos to aquatic organisms: A review**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 200, p. 110731, 2020.

IYER R.; IKEN B.; LEON, A. **Developments in alternative treatments for organophosphate poisoning.** Toxicology Letters. v. 233, p. 200–206, 2015.

JOHNSON, M. K et al. **Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides.** Emergency Medicine Australasia. v. 12, n. 1, p. 22–37, 2000b.

JOHNSON, M. K. J. D.; MEREDITH, T. J.; EYER, P.; HEATH, A. J.; LIGTENSTEIN, D. A.; MARRS, T. C.; SZINICZ, L.; VALE, J. A.; HAINES, J. A; **Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorous pesticides.** Emergency Medicine. v. 12, p.22-37, 2000.

KANEKAR, P. P.; BHADBHADE, B.; DESHPANDE, N. M.; SARNAIK, S. **Biodegradation of organophosphorus pesticides.** Proceedings of Indian National Science Academy. v. 1, p. 57-70, 2004.

KASSA, J. et al. **A Comparison of the Efficacy of New Asymmetric Bispyridinium Oximes (K027, K048) with Currently Available Oximes Against Tabun by In Vivo Methods.** Journal of Toxicology and Environmental Health. v. 69, n. 20, p. 1875–1882, 2006.

KASSA, J. **The influence of oxime and anticholinergic drug selection on the potency of antidotal treatment to counteract acute toxic effects of tabun in mice.** Neurotoxicity Research. v. 9, n. 1, p. 59–62, 2006.

KI, Y. W.; PARK, J. H.; LEE, J. E.; SHIN, I.C.; KOH, H.C. **JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis.** Toxicology Letters. v. 218, p. 235–245, 2013.

KITCHEN, B. D; DECORNEZ, H; FURR, J. R; BAJORATH. **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications.** Nature Reviews. v. 3, p 935-949, 2004.

KLICHKO, V. I.; RADYUK, S. N.; ORR, W. C. **Profiling catalase gene expression in Drosophila melanogaster during development and aging.** Arch. Insect Biochem. Physiol., v. 56, n. 1, p. 34-50; 2004.

KUCA, K. al. **Bisquaternary Oximes as Reactivators of Tabun-Inhibited Human Brain Cholinesterases: An in vitro Study.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. v. 101, n. 1, p. 25–28, 2007.

KUCA, K. et al. **Comparison of the potency of newly developed and currently available oximes to reactivate nerve agent-inhibited acetylcholinesterase in vitro and in vivo.** Chemico-Biological Interactions. v. 157–158, p. 367–368, 2005.

KUCA, K. et al. **Synthesis, Biological Evaluation, and Docking Studies of Novel Bisquaternary Aldoxime Reactivators on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon.** Molecules. v. 23, n. 5, p. E1103, 2018.

KUČA, K.; CABAL, J.; KASSA, J. **In vitro reactivation of sarin-inhibited brain acetylcholinesterase from different species by various oximes.** Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. v. 20, n. 3, p. 227–232, 2005.

KUČA, K.; KASSA, J.. **Oximes-induced reactivation of rat brain acetylcholinesterase inhibited by VX agent.** Human & Experimental Toxicology. v. 23, n. 4, p. 167–171, 2004.

KUCA, K; CABAL, J; KASSA, J. **A Comparison of the Potency of Newly Developed Oximes (K005, K027, K033, K048) and Currently Used Oximes (Pralidoxime, Obidoxime, HI-6) to Reactivate Sarin-Inhibited Rat Brain Acetylcholinesterase By in Vitro Methods.** Journal of Toxicology and Environmental Health. v. 68, n. 8, p. 677–686, 2005.

KUMARI, B. et al. **Monitoring of Butter and Ghee (Clarified Butter Fat) for Pesticidal Contamination from Cotton Belt of Haryana, India.** Environmental Monitoring and Assessment. v. 105, n. 1–3, p. 111–120, 2005.

KUMARI, B; MADAN, V. K.; KATHPAL, T. S. **Status of insecticide contamination of soil and water in Haryana, India.** Environmental Monitoring and Assessment. v. 136, n. 1–3, p. 239–244, 2007.

KUSHIK, J.; CHANDRABHAN, D. **Sources of exposure to and public implications of organophosphate pesticides.** Pan American Journal of Public Health. v. 14, n. 3, p. 171-185, 2003.

LEE, J. E.; LIM M. S.; PARK, J. H.; PARK, C. H.; KOH, H.C. **Nuclear NFkB contributes to chlorpyrifos-induced apoptosis through p53 signaling in human neural precursor cells.** NeuroToxicology, v. 42, p. 58–70, 2014.

LEE, J. E.; PARK, J. H.; SHIN, I. C.; KOH, H. C. **Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos.** Toxicology and Applied Pharmacology. v. 263, p. 148-162, 2012.

LORKE, D. E. et al. **Eight new bispyridinium oximes in comparison with the conventional oximes pralidoxime and obidoxime: *in vivo* efficacy to protect from diisopropylfluorophosphate toxicity.** Journal of Applied Toxicology. v. 28, n. 7, p. 920–928, 2008.

LORKE, D. E.; PETROIANU, G. A. **Reversible cholinesterase inhibitors as pretreatment for exposure to organophosphates. A review: Cholinesterase inhibitors as pretreatment for organophosphate exposure.** Journal of Applied Toxicology. v. 39, n. 1, p. 101–116, 2019.

LORKE, D. et al. **Entry of Oximes into the Brain: A Review.** Current Medicinal Chemistry. v. 15, n. 8, p. 743–753, 2008.

LORKE, D.E. et al. **Efficacy of two new asymmetric bispyridinium oximes (K-27 and K-48) in rats exposed to diisopropylfluorophosphate: comparison with pralidoxime, obidoxime, trimedoxime, methoxime, and HI-6.** Toxicology Mechanisms and Methods. v. 19, n. 4, p. 327–333, 2009.

LUCIĆ VRDOLJAK, A. et al. **Pretreatment with pyridinium oximes improves antidotal therapy against tabun poisoning.** Toxicology. v. 228, n. 1, p. 41–50, 2006.

MALLENDER, W. D.; SZEGLETES, T.; ROSENBERRY, T. L. **Acetylthiocholine Binds to Asp74 at the Peripheral Site of Human Acetylcholinesterase as the**

First Step in the Catalytic Pathway. *Biochemistry.* v. 39, n. 26, p. 7753–7763, 2000.

MENDES, A; CORRÊA P. R.; ANGELIS-PEREIRA, M. **Estresse oxidativo e sistemas antioxidantes: conceitos fundamentais sob os aspectos da nutrição e da ciência dos alimentos.** v. 2, p. 17, 2020.

MISHRA, A. Kr.; GOPESH, A.; SINGH, K. P. **Acute toxic effects of chlorpyrifos on pseudobranchial neurosecretory system, brain regions and locomotory behavior of an air-breathing catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch 1794).** *Drug and Chemical Toxicology.* p. 1–10, 2020.

MORALES, M M. **Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: Mito ou realidade?** *Cienc. Cult.* v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008

MORGAN, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de química teórica e modelagem molecular.** 1. ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007.

NACHON, F.; ROSENBERRY, T. L.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. **A second look at the crystal structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase in complex with tacrine derivatives provides insights concerning catalytic intermediates and design of specific insecticides.** *Molecules.* v. 25, 1198, p. 1-12, 2020.

NOSTRANDT, A. C.; PADILLA, S.; MOSER, V. C. **The Relationship of Oral Chlorpyrifos Effects on Behavior, Cholinesterase Inhibition, and Muscarinic Receptor Density in Rat.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. 58, n. 1, p. 15–23, set. 1997.

NURULAIN, S. M.; LORKE, D.E.; HASAN, M.Y. et al. **Efficacy of Eight Experimental Bispyridinium Oximes Against Paraoxon-Induced Mortality: Comparison with the Conventional Oximes Pralidoxime and Obidoxime.** *Neurotoxicity Research.* v. 16, n. 1, p. 60–67, 2009.

ÖZEN, T.; TAŞ, M. **Screening and evaluation of antioxidant activity of some amido-carbonyl oxime derivatives and their radical scavenging activities.** *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry,* 24:5, 1141-1147, 2009.

PARVATHI, D.; AMRITHA, A.; PAUL, F. D. **Wonder animal model for genetic studies – *Drosophila melanogaster* – its life cycle and breeding methods – A review.** *Sri Ramachandra Journal of Medicine.* v.2, p.33-38, 2009.

PETROIANU, G. A. et al. **Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6 and methoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to the organophosphate paraoxon.** *Journal of Applied Toxicology.* v. 26, n. 3, p. 262–268, 2006.

PETROIANU, G. A.; HASAN, M. Y.; NURULAIN, S. M. et al. **New K-Oximes (K-27 and K-48) in Comparison with Obidoxime (LuH-6), HI-6, Trimedoxime (TMB-4), and Pralidoxime (2-PAM): Survival in Rats Exposed IP to the Organophosphate Paraoxon.** *Toxicology Mechanisms and Methods.* v. 17, n. 7, p. 401–408, 2007b.

PETROIANU, G. A.; NURULAIN, S.M.; NAGELKERKE, N. et al. **Five oximes (K-27, K-48, obidoxime, HI-6 and trimedoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to methyl-paraoxon.** *Journal of Applied Toxicology.* v. 27, n. 5, p. 453–457, 2007.

PETRONILHO E. C.; PINTO A. C.; VILLAR, J. D. F. **Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química.** Revista Militar de Ciência e Tecnologia, 2011.

PEZZEMENTI, L; CHATONNET, A. **Evolution of cholinesterases in the animal kingdom.** Chemico-Biological Interactions. v. 187, n. 1–3, p. 27–33, 2010.

PIB DO AGRONEGÓCIO ALCANÇA PARTICIPAÇÃO DE 26,6% NO PIB BRASILEIRO EM 2020. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/boletins/pib-do-agronegocio-alcanca-participacao-de-26-6-no-pib-brasileiro-em-2020>. Acesso em: 2 set. 2021.

POSSAMAI, F. P. **Estudo do estresse oxidativo em órgãos de ratos wistar adultos induzidos à intoxicação por malation.** 73 p, Dissertação, (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2005.

PUNTEL, G. O. et al. **Antioxidant properties of oxime 3-(phenylhydrazono) butan-2-one.** Archives of Toxicology. v. 82, n. 10, p. 755–762, 2008.

PUNTEL, G. O. et al. **Butane-2,3-dionethiosemicarbazone: an oxime with antioxidant properties.** Chemico-Biological Interactions. v. 177, n. 2, p. 153–160, 2009.

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

RODRIGUES, N. R. et al. **Activation of p38MAPK and NRF2 signaling pathways in the toxicity induced by chlorpyrifos in Drosophila melanogaster: Protective effects of Psidium guajava pomífera L. (Myrtaceae) hydroalcoholic extract.** Arabian Journal of Chemistry, v. 12, n. 8, p. 3490–3502, dez. 2019.

ROJKIND, M. J.; DOMINGUES R.A.; NIETO, N. ; GREENWEL, P. **Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses.** Cellular and Molecular Life Sciences. v. 59, p. 1872-1891; 2002.

SAKURADA, K.; OHTA, H. **No promising antidote 25 years after the Tokyo subway sarin attack: A review.** Legal Medicine. v. 47, p. 101761, 2020.

SALGADO COSTA, C. et al. **Tadpoles of the horned frog Ceratophrys ornata exhibit high sensitivity to chlorpyrifos for conventional ecotoxicological and novel bioacoustic variables.** Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987). v. 235, p. 938–947, 2018.

SARTER, M.; BRUNO, J. P. **Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis.** Brain Research Reviews. v. 23, p. 28–46, 1997.

SAULSBURY, M. D.; HEYLIGER, S. O.; WANG, K.; JOHNSON, D. J. **Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells.** Toxicology. v. 259, p. 1–9, 2009.

SCULLY, L R.; BIDOCHKA, M J. **Developing insectmodels for the study of current and emerging human pathogens.** Microbiol Lett, v. 263, n. 1, p. 1-9, 2006.

SIDDIQUE, H. R.; GUPTA, S. C.; DHAWAN, A.; MURTHY, R. C.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. **Genotoxicity of Industrial solid waste leachates in Drosophila melanogaster.** Environmental and Molecular Mutagenesis. v. 46, p. 189-197, 2005.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. **Acetylcholinesterase: How is structure related to function?** *Chemico-Biological Interactions*. v. 175, n. 1-3, p. 3-10, 2008.

SILVA, M. H. **Effects of low-dose chlorpyrifos on neurobehavior and potential mechanisms: A review of studies in rodents, zebrafish, and *Caenorhabditis elegans***. *Birth Defects Research*. v. 112, n. 6, p. 445–479, 2020.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS. **Casos de intoxicação por Agrotóxico de Uso Agrícola por Unidade Federada, Segundo Circunstância Registrado em 2017**. Atualizado em 06/10/2020. Acesso em: 2 set. 2021

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS. **Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Centro. Região Sul, 2017**. https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Sul1_7.pdf. Atualizado em 25/05/2020. Acessado em: 04 set. 2021

SLOTKIN T. A.; OLIVER C. A; SEIDLER F. J. **Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination**. *Developmental Brain Research*. v. 157, n. 2, p. 172–180, 2005.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. **Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. Biomarkers**. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. 1. ed, Florida: Boca Raton Lewis Publishers, p. 235-335, 1992.

STEWART, J. P. **Mopac2016**. Stewart Computational Chemistry. Colorado Springs. CO. USA, 2016. <openmopac.net>.

SUROWIAK, A. K.; LOCHYŃSKI, S.; STRUB, D. J. **Unsubstituted Oximes as Potential Therapeutic Agents**. *Symmetry*. v. 12, p. 1-17, 2020.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. **Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein**. *Science*. v. 253, p 872-879, 1991.

TAN, B. H. et al. **In vitro and in silico Approaches to Study Cytochrome P450-Mediated Interactions**. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 20, n. 1, p. 319, 2017.

TERRY, A. V., JR. **Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potencial non cholinergic mechanisms**. *Pharmacology & Therapeutics*. v.134, n.3, p. 355-65, 2012.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN M. H. **MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking**. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

UBAID UR RAHMAN, H. et al. **A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms,**

exposures and mitigation strategies. Science of The Total Environment. v. 755, p. 142649, 2021.

VALADARES, A; ALVES, F; GALIZA, M. **O crescimento do uso de agrotóxicos: uma análise descritiva dos resultados do censo agropecuário 2017.** n. 65, p. 42, 2017.

VALE, J. A. **Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning.** Toxicology Letters. v. 102-103, p. 649-652, 1998.

VASCONCELOS, Y. Agrotóxicos na berlinda. Pesquisa Fapesp. v. 19, n. 271, p. 18-27, 2018.

WEISSMAN, B. A.; RAVEH, L. **Therapy against organophosphate poisoning: The importance of anticholinergic drugs with antiglutamatergic properties.** Toxicology and Applied Pharmacology. v. 232, n. 2, p. 351–358, 2008.

WHITWORTH, J. A.; WES, D. P.; PALLANCK, J. L. **Drosophila models pioneer a new approach to drug discovery of Parkinson's disease.** v. 11, n. 3-4, p. 119-126, 2006.

WILSON, B. W. et al. **Reactivation of Organophosphorus Inhibited AChE with Oximes.** In: **ORGANOPHOSPHATES CHEMISTRY, FATE, AND EFFECTS.** Elsevier, p. 107–137, 1992. E-book. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080917269500094>. Acesso em: 11 ago. 2021.

WOREK, F. et al. **Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates.** Archives of Toxicology. v. 76, n. 9, p. 523–529, 2002.

WOREK, F; THIERMANN, H; WILLE, T. **Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair.** Chemico-Biological Interactions. v. 259, p. 93–98, 2016.

YAO, H.; CHUANLING, Q.; WILLIAMSON, M. S.; DEVONSHIRE A. L. **Characterization of the acetylcholinesterase gene from insecticide-resistant houseflies *Musca domestica*.** Chinese Journal Biotechnology. v. 13, p. 177–183, 1997.

ZHU, L. et al. **Acute toxicity, oxidative stress and DNA damage of chlorpyrifos to earthworms (*Eisenia fetida*): The difference between artificial and natural soils.** Chemosphere. v. 255, p. 126982, 2020.

ŽUNEC, S. et al. **Comparative determination of the efficacy of bispyridinium oximes in paraoxon poisoning.** Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. v. 66, n. 2, p. 129–134, 2015.

ŽUNEC, S. et al. **In Vivo Evaluation of Cholinesterase Activity, Oxidative Stress Markers, Cyto- and Genotoxicity of K048 Oxime - a Promising Antidote against Organophosphate Poisoning.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. v. 114, n. 4, p. 344–351, 2014.

Apêndice 1. Alinhamento entre as sequências de resíduos de aminoácidos das AChEs de *D. melanogaster* (PDB: 6XYS), *H. sapiens* (PDB: 5HQ3), *T. californica* (PDB: 1EA5) e *Mus musculus* (2GYV).

cov	pid	1	:	80
1	6XYS	100.0%	100.0%	----VIDRLVVQTSSGPVGRSVTVQGREVHVYTGIPYAKPPVEDLRFKPVPAEPWHGVLDATGLSATCVQERYEYEPG
2	1EA5	91.2%	34.8%	---DDHSELLVNTKSGKVMGTRVPLSSHISAFLLGIPFAEPPVGNMRFRRPEPKKPWSGVWNASTYPNNCOQYVDEQEPG
3	2GYV	91.7%	36.5%	-EGREDPQLLVRVRGGQIRGIRLKAPGGPVSAFLGIPFAEPPVGSRRFMPPEPKRPWSGVLDATTFQNVICYQYVDTLYPG
4	5HQ3	92.4%	37.2%	MEGREDAELLVTRGGRLRGRIRLTTPGGPVSAFLGIPFAEPPVGPRRFRPEPKQFWSGVWDATTFQNVICYQYVDTLYPG
cov	pid	81	:	160
1	6XYS	100.0%	100.0%	FSGEEIWNPNNTVSEDCLYINWVAPAKARLRHGRGANNGEHPNGKQADTDHLIHNGNEQNTTNGLPILWIYGGGFMTGS
2	1EA5	91.2%	34.8%	FSGSEMWNPNREMSDCLYLNIVVPSPR-----PKST-TVMVWIYGGGFYSGS
3	2GYV	91.7%	36.5%	FEGTEMWNPNRELSDCLYLNWVTPYPR-----PASPTPVLIWIYGGGFYSGA
4	5HQ3	92.4%	37.2%	FEGTEMWNPNRNLSDCLYLNWVTPYPR-----PKNPAPVMVWIYGGGFYSGS
cov	pid	161	:	240
1	6XYS	100.0%	100.0%	ATLDIYNADIMAAVGNVIVASFQYRVGAFGLHLAPEMPSEFAEEAPGNVGLWDQALAIRWLKDNAHAFGGNPEWMTLEF
2	1EA5	91.2%	34.8%	STLDVYNGKYLAYTEEVVLVLSLSYRVGAFGLALHG-----SQEAPGNVGLLDQRMALQVVDNIQEFGGDPKTVTIF
3	2GYV	91.7%	36.5%	ASLDVYDGRFLAQVEGAVLVSMNYRVGTFGLALPG-----SREAPGNVGLLDQRLALQVVDENIAAFGGDPMSVITLEF
4	5HQ3	92.4%	37.2%	SSLDVYDGRFLVTRTERVVLVSMNYRVGAFGLALPG-----SREAPGNVGLLDQRLALQVVDENIAAFGGDPTSVITLEF
cov	pid	241	:	320
1	6XYS	100.0%	100.0%	ESAGSSSVNAQLMSPVTRGLVCRGMMQSGTMNAPWVSHMTSEKAVEIGKALINDCNCNASMLKTNPAHVMSCMRSVDAKTI
2	1EA5	91.2%	34.8%	ESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCPWASVSVAEGRRRAVELGRNLNCNL----NSDEELIHCLREKKPQEL
3	2GYV	91.7%	36.5%	ESAGAASVGMHILSLPSRSLFHRVAVLQSGTPNGPWATVSAGEARRRATLLARLVGCPPGGAGGNDTELIACLRTPAQDL
4	5HQ3	92.4%	37.2%	ESAGAASVGMHILSPPSRGLFHRVAVLQSGAPNAPWAYVSRERARRRALQAKLVGCPPGGTGGNDTELVACLRNRPPQEL
cov	pid	321	:	400
1	6XYS	100.0%	100.0%	SVQQWNSY--SGILSFPASPTIDGAFLPADPMTLMKTADLKDYDILMCNVRDEGTYFLLYDFIDYFDKDDATALPRDKYL
2	1EA5	91.2%	34.8%	IDVEWNVLPFDSIFRFSEFVPVIDGEFFPTSLESMLNSGNFKKTQILLGVNKDEGSFELLYGAPG-FSKDSESKISREDFM
3	2GYV	91.7%	36.5%	VDHEWHVLPQESIFRFSEFVPVVDGDFLSDTPEALINTGDFODLQVLVGVVVKDEGSYFLVYGVPG-FSKDNESLISRAQFL
4	5HQ3	92.4%	37.2%	VNHEWHVLPQESVFRSEFVPVVDGDFLSDTPEALINNGDFKGLDVLVGVVVKDEGSYFLVYGAPG-FSKDNESLISREDFM

```

cov    pid 401      .      .      .      .      :      .      .
480
1 6XYS| 100.0% 100.0% EIMNNIEGKATQAEREALIFQYTSWEGN-PGYQNQQQIGRAVGDHFFTCPTNEYAQUALAERGASVHYYYFTHRTSTSLWG
2 1EA5|  91.2%  34.8% SGVKLSVPHANDLGLDAVTLQYTDWMDDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFGNGTYLYEFNHRASNLVWP
3 2GYV|  91.7%  36.5% AGVRIGVPPQASDLAAEFAVVLHYTDWLHPEDPTHLRDAMSAVVGDNVVCVPAQLAGRLAQQGARVYAYIFEHRASTLTWP
4 5HQ3|  92.4%  37.2% EGVRVGVPPQVSDLAAEFAIVLHYTDWLHPEDPAKNRDALSDVVGDNVVCVPAQFAQRYAANGARVYAYVFEHRSSTLPWP

cov    pid 481      .      5      .      .      .      :      .
560
1 6XYS| 100.0% 100.0% EWMGVLHGDEIEYFFGQPLNNSLQYRPVERELGKRMLSAVIEFAKTGNPAQD----GEWPNFSKEDPVYYIFSTDDKIE
2 1EA5|  91.2%  34.8% EWMGVIHGVEIEFVFGLEPLVKELNYTABEEALSRRIMHYWATFAKTGNPNPHS-QESKWPLETTKEQKFIDLN--TEPM
3 2GYV|  91.7%  36.5% LWMGVPHGVEIEFIFGLPLDPSLNYTTEERIIFAQRMLKYWTNFARTGDPNDPRDSKSPQWPPYTAAQQYVSLN--LKPL
4 5HQ3|  92.4%  37.2% EWMGVPHGVEIEFIFGLPLDPSRNYTKBEKIFARRMLRYWANFARTGDPNEPRDPKAPQWPPYTADEQKYVSLD--LRPL

cov    pid 561      .      .      .      .      ] 592
1 6XYS| 100.0% 100.0% KLARGPLAARCSFWNDYLPKVRWAGTCDGDS
2 1EA5|  91.2%  34.8% KVHQRLRVQMCVFWNQFLPKLLNATAC-----
3 2GYV|  91.7%  36.5% EVRRGLRAQTCAFWNRELPKLLSAT-----
4 5HQ3|  92.4%  37.2% EVRRGLRAQACAFWNRELPKLLSATDTLD---
```