

MODELAGEM COMPUTACIONAL DA PARAOXONASE-1 DE HUMANOS: ESTUDO DE CASO ENVOLVENDO PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Leonardo Cândido Barbosa¹

Marcelo Ferreira Novelino²

Alan Cláudio do Vale Guimarães³

Ellen Zimmermann Fattori⁴

Vinicius Schmitz Pereira Nunes⁵

leonardocbio@hotmail.com

ÁREA DO CONHECIMENTO: Ciências Biológicas

RESUMO

O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas na agricultura, consumindo 20% de todo agrotóxico comercializado no mundo. Desta porcentagem, um alto índice é de pesticidas organofosforados, que são prejudiciais à saúde humana quando usados em excessos ou incorretamente, acarretando problemas drásticos de contaminação. Além disso, são utilizados também como armas químicas por possuírem ação neurotóxica de inibir a enzima acetilcolinesterase, impedindo-a de hidrolisar a acetilcolina em colina e ácido acético, função fundamental para garantir o controle de transmissão nervosa no organismo. Os inúmeros casos de intoxicação mundial, os perigos iminentes das armas químicas e o consumo massivo de agrotóxicos organofosforados fazem com que seja imprescindível e totalmente necessário que haja tratamentos eficazes para amenizar e diminuir exponencialmente os riscos da exposição aos compostos organofosforados. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo propor um modelo tridimensional para a proteína paraoxonase-1 de humanos (PON1), avaliando a afinidade de ligação dos compostos organofosforados a seu sítio ativo através da abordagem de docking molecular, já que na literatura esta proteína é descrita como capaz de hidrolisar organofosforados na corrente sanguínea por apresentar alta promiscuidade enzimática e não se inativar após a hidrólise de metabólitos. Os resultados obtidos permitem a constatação da eficiência enzimática da paraoxonase em se ligar a compostos organofosforados, salientando sua possível aplicação, após maiores estudos, como tratamento suplementar a intoxicações por pesticidas organofosforados.

PALAVRAS-CHAVE: intoxicação, organofosforados, paraoxonase

INTRODUÇÃO

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia da Faculdade Vértix Trirriense – Univértix.

² Bacharel em Ciências Biológicas - Especialista em Análises Clínicas, Hematologia e Hemoterapia – Mestre em Imunologia - Docente da Faculdade Vértix Trirriense – Univértix.

³ Licenciado em Química – Mestre em Química - Docente da Faculdade Vértix Trirriense – Univértix.

⁴ Farmacêutica Bioquímica – Especialista em Análises Clínicas – Mestranda em Ciências Naturopáticas - Docente da Faculdade Vértix Trirriense – Univértix.

⁵ Licenciado em Biologia e Física – Mestre e Doutor em Modelagem computacional - colaborador do Grupo de Modelagem Computacional Aplicada (GMCA) da UFJF.

Os pesticidas organofosforados (OPs) são uma classe de moléculas muito utilizada na agricultura como defensivos agrícolas, são rapidamente hidrolisados, tanto no meio ambiente como nos meios biológicos. A estrutura química destes compostos são ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio. São classificados em quatro classes toxicológicas (pouco tóxico, medianamente, altamente e extremamente tóxico), e apesar de potencializarem as produções nas lavouras, os organofosforados podem ser prejudiciais à saúde humana quando usados em excessos ou incorretamente (AMARAL, 2007)

O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas na agricultura, consumindo 20% de todo agrotóxico comercializado no mundo. A grande comercialização de insumos agroquímicos no Brasil se deve ao fato do modelo agrário estar baseado em monocultivos para exportação, setor primário que gera altos índices de lucro. Durante os últimos anos, ocorreu a intensificação da liberação de agrotóxicos em todo o território nacional, só no ano de 2019, 474 registros foram liberados. Uma parte considerável desses produtos pertence à classe I, aqueles classificados como extremamente tóxicos a saúde humana.

Os pesticidas organofosforados foram banidos em alguns países devidos os seus altos índices de toxicidade, são também considerados as armas químicas mais perigosas do mundo, pois possuem ação neurotóxica de inibir a enzima acetilcolinesterase, função fundamental para garantir o controle de transmissão nervosa em nosso organismo (SILVA *et al.*, 2012). O Ministério da Saúde constatou que no período de 1999 a 2009 ocorreram mais de 62 mil casos de intoxicações por agroquímicos no Brasil, sendo apresentados 1876 casos de óbito com 2/3 sendo ocasionados por pesticidas organofosforados. Além disso, em outra estimativa apresentada pelo Ministério de Saúde a cada 50 casos de intoxicação por agroquímicos apenas 1 caso é notificado (KORBES, 2009; SILVA *et al.*, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2016).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os inseticidas da classe dos organofosforados são absorvidos pelo organismo pelas vias oral, respiratória e cutânea, e atuam inibindo a acetilcolinesterase, um neurotransmissor de grande importância na transmissão dos impulsos nervosos, além de atuar na junção neuromuscular e estar implicada no controle das áreas cerebrais que envolvem as ações de atenção, memória e aprendizagem (CALDAS, 2000; OGA, 2003). Para que ocorra o impulso nervoso é necessário que o neurotransmissor acetilcolina seja emitido por um neurônio através da fenda sináptica e interaja com os receptores nicotínicos e muscarínicos do próximo neurônio, garantindo assim a transmissão dos impulsos nervosos e a estimulação dos órgãos e dos músculos (SILVA *et al.*, 2012). Apesar de acetilcolina ser de extrema importância, ela precisa ser regulada para que não ocorra um excesso de impulsos nervosos e uma crise colinérgica com superestimulação das estruturas enervadas (SILVA *et al.*, 2012). É neste momento que entra em ação a acetilcolinesterase, ela irá regular a acetilcolina hidrolisando-a em colina e acetato (ácido acético), para que não ocorra a crise colinérgica no organismo (OGA, 2003).

Os organofosforados possuem uma grande afinidade pelo sítio ativo da acetilcolinesterase, o que ocasiona a sua inibição. A inibição ocorre no sistema nervoso central e periférico, com a inativação da enzima não há regulação da acetilcolina, provocando um aumento em sua concentração e assim a crise colinérgica com convulsões, colapso do sistema nervoso central, perda do controle muscular, problemas respiratórios, arritmia cardíaca, fraqueza, lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores, distúrbios cardiorrespiratórios, broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas e bradicardia, podendo se tornar letal com óbito por parada respiratória central ou periférica (SILVA *et al.*, 2012; PERES, 2003).

Atualmente, o tratamento comumente utilizado nestes casos é o uso de uma sequência de drogas antinicotínicas, antimuscarínicas e anticonvulsivantes administradas em ordem. A primeira droga a ser administrada é a Atropina, uma substância anticolinérgica que diminui os efeitos do acúmulo de acetilcolina; a segunda é o Diazepam, um depressor do sistema nervoso, que tem como finalidade

conter os efeitos da síndrome colinérgica; e por último é aplicado doses de Oximas, um reativador da acetilcolinesterase (SILVA *et al.*, 2012).

Essas abordagens são pouco eficazes para mitigar os efeitos agudos e de longo prazo de todos os agentes tóxicos, melhorando a sobrevivência, mas não reduzindo a incapacidade ocasionada por danos cerebrais irreversíveis. Novas linhas de pesquisas estão sendo desenvolvidas na área com o intuito de encontrar métodos de tratamento com maior eficiência. Uma dessas linhas de pesquisa consiste na estratégia alternativa de eliminar os agentes neurotóxicos da corrente sanguínea através de moléculas chamadas biovarredores, proteínas com capacidade de se ligarem aos agentes neurotóxicos e inibi-los, impedindo que cheguem à acetilcolinesterase e, por conseguinte o desencadeamento da crise colinérgica. Segundo Nachon *et al.* (2013), as proteínas biovarredoras são classificadas em biovarredores estequiométricos, pseudo-catalíticos e catalíticos, além de apresentarem as enzimas humanas como os candidatos preferidos para o tratamento, já que existem numerosas enzimas e proteínas como defesa natural contra os organofosforados, mas suficientes apenas para proteção contra ínfimas exposições.

Os biovarredores catalíticos são enzimas degradantes de organofosforados que não se inativam após a hidrólise e nem precisam de reativadores de oxima para continuar a sua função, sendo a proteína Paraoxonase-1 Humana (PON1) a melhor representante deste grupo. Seriam os agentes de tratamento mais adequados por continuarem ativos na corrente sanguínea, precisando de uma pequena dose para fornecer maior proteção em comparação com as grandes doses de biovarredores estequiométricos que seriam necessárias (NACHON *et al.*, 2013; MATA *et al.*, 2014).

A Paraoxonase-1 pertence a uma família de genes que apresentam uma gama de atividades hidrolíticas importantes, inibem a oxidação lipídica da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e atuam no metabolismo de drogas, além de estarem envolvidas na prevenção da aterosclerose (HAREL *et al.*, 2004). Uma característica interessante desta proteína é que apresenta uma promiscuidade enzimática elevada, isto é, evidencia a capacidade de um único sítio ativo acomodar substratos diferentes do substrato nativo da enzima (BEN-DAVID *et al.*, 2012; HAREL *et al.*). A sequência

genômica da paraoxonase sérica humana foi determinada em 1991, e apresentou em estudos posteriores à capacidade de hidrolisar vários inseticidas organofosforados, tendo seu nome derivado de um de seus substratos in vitro mais utilizados, o paraoxon (LA DU, 2004). Os OPs são metabolizados no corpo pela PON1, transformando-se em metabólitos inativos de baixa toxicidade e sem capacidade de inibir a acetilcolinesterase.

Apesar de sua sequência ter sido determinada, ainda não há estruturas tridimensionais da paraoxonase-1 de humanos, ou seja, ainda não foram realizadas técnicas experimentais que comprovam seu padrão de enovelamento e, conseqüentemente, sua estrutura nativa, sendo encontradas apenas estruturas de outros animais. O mecanismo catalítico da PON1 está relacionado principalmente com os resíduos His115, His134, Glu53 e Asn168, na qual a His115 funciona como uma base geral para desprotonar a água reativa gerando um íon hidróxido de ataque na primeira metade da reação para gerar um complexo de transição. De acordo com La Du (2004), são encontrados 200 polimorfismos genéticos para a PON1 humana. Os polimorfismos genéticos são variações na sequência do nucleotídeo quando expressa em mais de 1% dos cromossomos da população, podendo ocorrer em regiões codificadoras, reguladoras e intrônicas, que influenciam parcialmente na atividade enzimática. Um dos polimorfismos mais estudado da PON1 é o Q192R, onde ocorre a substituição do aminoácido glutamina por arginina na posição 192, originando duas aloenzimas cujas atividades relativas são substrato dependente. Deste modo, substratos como paraxon e fenitroxon, organofosforados amplamente empregados como inseticidas, são hidrolisados mais rapidamente pela aloenzima R, e outros ainda, como diazoxon, somam e sarin são mais rapidamente hidrolisados pela aloenzima Q (COSTA *et al*; 2003). A substituição do resíduo não altera a expressão da enzima, porém influencia na atividade enzimática, o que nos faz refletir que esta posição esteja associada a sua eficiência na catálise (RAINWATER *et al*.; 2009).

Todas as informações até aqui evidenciadas só corroboram a necessidade emergente de maior aprofundamento em estudos nessa área. Esta é a grande convicção do presente estudo, onde será proposto um modelo tridimensional para a

proteína paraoxonase-1 de humanos e testar através do método de ancoragem molecular a eficácia e eficiência de polimorfismos da proteína Paraoxonase-1 de humanos, na posição 192, a fim de sugerir um tratamento para casos de intoxicação por pesticidas organofosforados

METODOLOGIA

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa qualitativa aplicada de caráter experimental explicativo que utilizará a modelagem comparativa para gerar um modelo tridimensional da PON1. O primeiro passo é a busca da sequência de aminoácidos e escolha do molde (template) que irá ser trabalhado. A sequência de aminoácidos da PON1 de humanos foi obtida no banco de dados UniProt KB, o principal recurso de alta qualidade, abrangente e de livre acesso do mundo de sequência de proteínas e informações funcionais. Por meio da ferramenta BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), buscou-se no banco de dados Protein Data Bank (PDB) (acesso aberto) proteínas moldes que contenham maior similaridade com a proteína primária utilizando a sequência da PON1 encontrada no UniProt. Quanto maior o número de resíduos idênticos ou similares, maiores são as chances do molde ser selecionado como ideal (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Para o alinhamento entre a sequência da PON1 e o molde selecionado no PDB, foi utilizado o programa Clustal Omega (SIEVERS; HIGGINS, 2018). Somente com um alinhamento preciso é que pode se obter uma modelagem satisfatória.

Para a realização da modelagem do modelo teórico da estrutura tridimensional da PON1 de humanos foi utilizado o programa Modeller 9.22 (WEBB; SALI, 2016). O alinhamento então é submetido ao programa para que possam ser gerados modelos tridimensionais da PON1 a partir do molde selecionado no PDB. A validação do modelo consistiu por intermédio de avaliações estereoquímicas do mapa de Ramachandran (RAMACHANDRAN, 1963), e do menor valor do DOPE score (Discrete Optimized Protein Energy) calculado pelo programa Modeller. A convergência desses dois parâmetros leva a escolha do melhor modelo. Para garantir maior corroboração a escolha do modelo, foram empregadas as técnicas de validação Errat (COLOVOS; YEATES, 1993) e Verify 3D (LUTHY *et al.*, 1992), através do

metasserver SAVES (versão 5). Com o modelo definido e validado, a fim de avaliar a posição 192 na qual estudos já citados ao decorrer do trabalho citam maiores atividades catalíticas (COSTA et al; 2003), foi realizada alterações no modelo através do programa Schrodinger Maestro versão Acadêmica 18.3.

Para verificar se o programa a ser utilizado na ancoragem molecular, o DockThor (MAGALHÃES *et al.* 2014), é capaz de prever a pose de um ligante a uma proteína cristalográfica, foi submetido o molde selecionado na etapa de modelagem comparativa e seu ligante ao programa em questão. O DockThor necessita de coordenadas do centro de massa dos resíduos catalíticos da proteína, que para o molde selecionado foram obtidos como X= -7.4756, Y= -21.025 e Z= 29.572, e tamanho da grid que foi utilizado 11 pontos para cada eixo, enquadrando o sítio ativo e a posição 192. Se a pontuação score obtida for semelhante a encontrada no banco de dados para a pose do ligante, o programa estará apto a predizer a energia de interação entre os modelos e os ligantes organofosforados. Os ligantes foram selecionados devido aos seus níveis de toxicidade e obtidos no PubChem: Sarin (PubChem:7871), Paraoxon (PubChem: 9395), Parathion (PubChem: 991), Malathion (PubChem: 4004), Glifosato (PubChem: 3496).

Para realizar a ancoragem receptor-ligante foi usado a versão 2 do programa DockThor (MAGALHÃES *et al.* 2014). Na interface do programa, é necessário anexar a arquivo da proteína no local reservado para sua incorporação, adicionar os co-fatores de água (posição 358 e 359) e cálcio (posição 356) da PON1 obtidos pelo Maestro 19.1 versão acadêmica, e anexar o arquivo com a molécula do ligante. O centro da caixa é definido como as coordenadas do centro de massa dos resíduos catalíticos da proteína em estudo, em nosso caso os resíduos His115, Glu53, His134 e Asn168, obtendo o ponto cujas coordenadas são: X= 14.130, Y= -24.224 e Z= -4.878. Outra informação que deve ser inserida é o tamanho da grid, que foi utilizado 11 pontos para cada eixo, a fim de enquadrar o sítio ativo da proteína e a posição do resíduo 192. Os três modelos foram anexados ao programa um a um, repetindo o processo para cada um dos ligantes escolhidos, totalizando 15 ancoragens. Para visualização e renderização das imagens foi empregado o programa Pymol.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A sequência de aminoácidos da PON1 de humanos foi obtida no banco de dados UniProt KB, sob identificação ID P27169, com 355 aminoácidos. A busca primária por possíveis modelos no PDB usando o algoritmo BLAST mostrou que a PON1 de humanos compartilha 84% de identidade e 91% de similaridade com a estrutura da PON1 de *Oryctolagus cuniculus* (coelho-europeu), com ID 3SRG (BEN-DAVID *et al.*, 2012), como a identidade da sequência era muito alta (84%), foi obtido um alinhamento preciso e ideal para o modelo alvo, sem inserções ou deleções não naturais.

A partir do alinhamento das sequências, foram gerados 50 modelos pelo programa Modeller. Analisando os modelos gerados, observando o menor DOPE score fornecido pelo próprio programa e se os resíduos encontravam-se em regiões favoráveis através do gráfico de Ramachandran, selecionamos o melhor modelo gerado. A premissa do gráfico para uma estrutura proteica de boa qualidade é que ela deve apresentar 90% de seus resíduos na região favorável. O modelo selecionado PON1 de humanos apresenta 93.8% de todos os resíduos na região favorável e 98.8% dos resíduos na região permitida (figura 1).

Para complementar a fase de validação, o modelo foi submetido ao metasever SAVES com o intuito de ser analisado pelos métodos Verify3D e Errat. O programa Verify 3D mostrou um perfil 3D-1D médio convincentemente bom, com 92,94% de resíduos complementando a sequência da concordância de estrutura, bem acima do valor de corte de 80%. O fator de qualidade geral do ERRAT foi de 86.4458, superior ao valor aceitável de 70-80, indicando confiabilidade da estrutura fornecida. Todas essas pontuações de validação de estrutura são altamente positivas, sugerindo que a

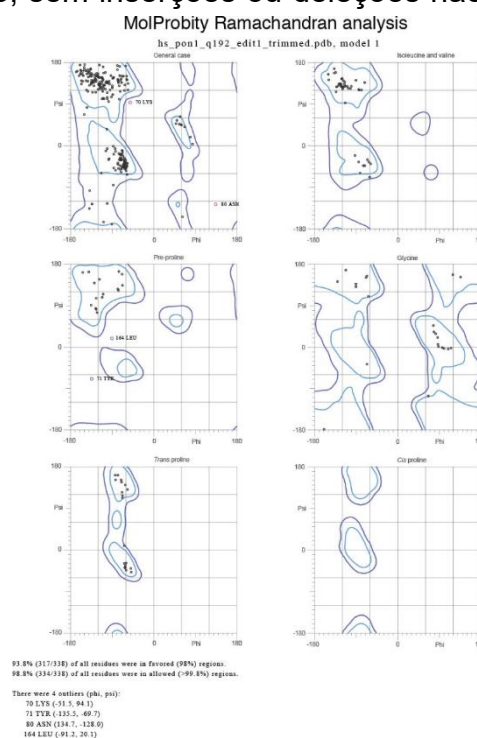


Figura 1: Resultados do gráfico de Ramachandran para o modelo da PON1 na forma selvagem (Q192).

estrutura PON1 construída através do procedimento de modelagem de homologia é consistente para uso em outros estudos.

O modelo gerado a partir da modelagem comparativa é considerado o estado selvagem da isoforma em humanos, apresentando o resíduo glutamina na posição 192 (Figura 2). Com o Maestro foi possível gerar mais dois modelos fazendo a substituição de resíduos nesta posição, obtendo o modelo

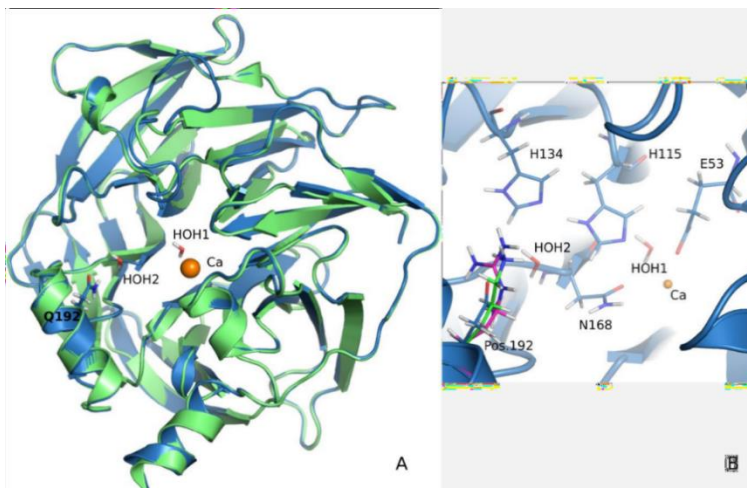


Figura 2: Modelo tridimensional da PON1, obtido através da modelagem comparativa utilizando o molde 3SRG. (A) Sobreposição do modelo PON1 (azul) e do template 3SRG (verde). (B) Zoom no sítio ativo, com destaque aos resíduos catalíticos e a posição 192 (POS.192)

denominado R192, na qual ocorre a substituição da glutamina pelo resíduo arginina (Q192R) e o modelo K192, substituição da glutamina por lisina (Q192K). O resíduo lisina foi utilizado nesta situação por ser o resíduo de aminoácido que está presente no molde de coelho utilizado para a modelagem, a fim de verificar se essa substituição interfere na afinidade de ligação do ligante durante a etapa de docking. Estes modelos foram gerados para serem utilizados na análise de ancoragem molecular, com intuito de verificar afinidade com ligantes organofosforados e inspecionar diferenças de valores com a substituição de resíduos na posição 192 da proteína.

Com o intuito de avaliar a eficácia da ferramenta DockThor e o tamanho e configuração da grid em prever a melhor posição de interação (pose) entre o sítio ativo de proteína e os ligantes, foi submetido o cristal 3SRG no programa a fim de encontrar a pose de encaixe desta com seu ligante 2-Hidroxiquinolina. A proteína 3SRG foi o molde selecionado na modelagem comparativa, lograda como cristal em complexo com a 2- hidroxiquinolina, um inibidor competitivo para PON1 que em sua forma tautomérica é uma lactama e, portanto, um análogo de lactona, que possui forte afinidade ao sítio ativo da PON1 e que se sobrepõe aos substratos em um grau que impede a ligação mútua (KHERSONSKY & TAWFIK, 2005). Os resultados são obtidos

através de dois parâmetros: Score, função de pontuação empírica linear e Total Energy, usada para classificar diferentes modos de ligação do mesmo composto pelas interações intermoleculares e intramoleculares. Quanto menor for a função Score que o ligante apresenta na hora do acoplamento melhor será a pose.

A 2- Hidroxiquinolina apresentou pontuação Score -8,376 e Total Energy de -3,849. Através destes dados é possível afirmar que a pose obtida pela ferramenta DockThor é bem semelhante àquela encontrada no banco de dados PDB, evidenciando que este programa está apto para as análises de energia de interação entre os modelos gerados e os compostos organofosforados (Figura 3).

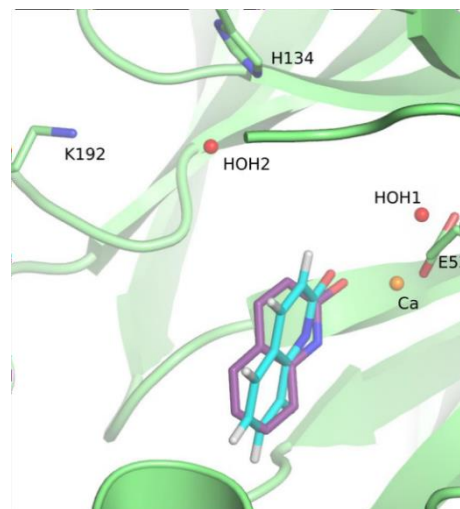


Figura 3: Pose da 2-Hidroxiquinolina ao template 3SRG (verde). Sobreposição entre o ligante do cristal (vinho) e o redocking (azul). RMSD: 0.746.

Tabela 1. Resultados do *docking* molecular, valores obtidos pela ferramenta DockThor. *(kcal/mol)

Ligantes	Docking					
	K192		Q192		R192	
	Score*	T. Energy*	Score*	T. Energy	Score*	T. Energy
Sarin	-6.902	-21.749	-6.895	-21.788	-6.879	-21.790
Glifosato	-6.017	-37.445	-5.988	-36.303	-6.115	-36.184
Paraoxon	-7.317	-6.075	-6.913	-3.989	-7.304	-4.763
Parathion	-7.325	-3.516	-7.415	-2.689	-7.355	-3.883
Malathion	-7.221	-36.435	-7.007	-36.956	-6.791	-35.504

O programa DockThor apresentou, de maneira geral, uma boa eficiência em analisar a energia de interação dos ligantes organofosforados no sítio ativo dos modelos propostos, levando em consideração os parâmetros de Energia Total (T. Energy) e Pontuação (Score) (Tabela 1). Quanto mais negativo o Score, melhor será a posição de ancoragem do ligante no sítio de ligação do receptor.

Os melhores scores nos evidenciam que estes são os resultados mais estáveis, ou seja, de como as moléculas de organofosforados deveriam estar acopladas no sítio ativo da enzima em questão. Através destes dados, é possível selecionar as melhores

poses em que cada composto se liga aos resíduos do sítio ativo da PON1, sendo elas: Sarin, no modelo K192 com score de -6.902 (Figura 4. A); Glifosato no modelo R192, com score -6.115 (Figura 4. B); Paraoxon com o modelo K192, score -7.317 (Figura 4. C); Parathion no modelo Q192, melhor score -7.415 (Figura 4.D) e Malathion no modelo K192, com o melhor score de -7.221 (Figura 4.E). O atracamento dos ligantes organofosforados no sítio ativo dos modelos se dá por ligações iônicas e ligações de hidrogênio entre os resíduos histidina 134 e 135, glutamato 53 e aspartato 168, além do cálcio catalítico, que auxilia na estabilização do complexo.

É imprescindível também asseverar que o modelo K192 foi aquele em que apresentou as melhores pontuações dentre os modelos gerados, com 3 poses definidas para os organofosforados sarin, paraoxon e malathion. Como os outros resultados dos demais modelos obtiveram valores aproximados, pode-se dizer que

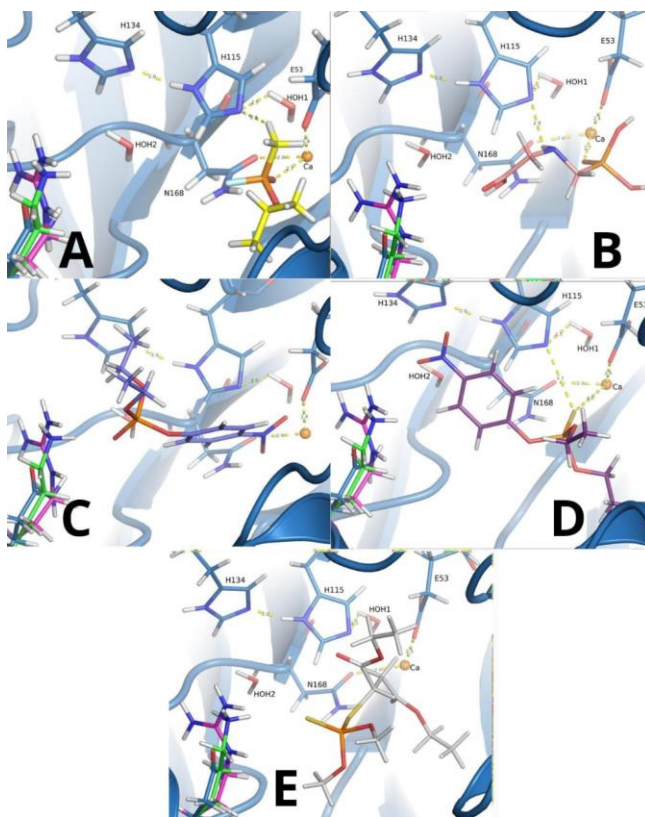


Figura 4: A) Atracamento do OP Sarin ao sítio ativo do Modelo K192. B) Ancoragem do Glifosato no sítio ativo do modelo R192. C) Atracamento do Paraoxon ao sítio ativo do modelo K192. D) Ancoragem do OP Parathion ao sítio ativo do modelo Q192, pose obtida pelo menor score 7.415. E) Ancoragem do ligante Malathion ao sítio ativo do modelo K192.

houve consistência nos dados e, por conseguinte, no local de ligação receptor-ligante, nos evidenciando que os modelos poderiam atuar no processo de retirada dos compostos organofosforados da corrente sanguínea antes que alcançassem a acetilcolinesterase.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados apresentados, percebe-se que o uso de abordagens de modelagem comparativa para a predição tridimensional de proteínas foi favorável para

obtenção de 50 modelos tridimensionais da paraoxonase-1 de humanos, sendo possível a validação de um modelo teórico funcional qualificado da isoforma selvagem da proteína para estudos computacionais. Através deste único modelo validado, foi possível a obtenção de dois modelos mutados na posição 192 na qual a literatura descreve como ponto de divergência catalítica em polimorfismos de PON1.

Na fase de ancoragem molecular foi permissível a constatação da eficiência enzimática da paraoxonase em se ligar a compostos organofosforados, salientando sua possível aplicação, após maiores estudos, como tratamento suplementar a intoxicações por pesticidas organofosforados, impedindo-os de atingir a acetilcolinesterase e ocasionar maiores sequelas aos pacientes contaminados. Quando equiparados os resultados do *redocking* no cristal 3SRG com os resultados do docking nos modelos, é notório contemplar que houve consistência nos dados obtidos, tendo os compostos organofosforados valores aproximados da 2-hidroquinolina, considerado inibidor competitivo que se sobrepõe aos substratos da PON1. Por certo, esta análise só corrobora a eficácia da proteína em se ligar aos OPs.

Além disso, foi possível averiguar a ocorrência de diferenças nos resultados do docking na posição 192, corroborando estudos que apontam essa região como importante para a catálise proteica da paraoxonase após resultados obtidos denotarem diferenças entre os modelos gerados. Quando analisados, é explícito enfatizar maior êxito do modelo K192 em se ligar aos ligantes organofosforados por apresentar menores valores ao parâmetro score em comparação aos demais modelos.

Mediante aos resultados dissertados, percebe-se que há uma necessidade de aprofundar em maiores informações o assunto, principalmente em relação a técnica de Dinâmica Molecular que será capaz de apurar divergências na energia de ligação da PON1 aos organofosforados, quando analisados sob a óptica da mudança conformacional proteica. Deste modo, será possível identificar mudanças ao perfil eletrostático da proteína e se ocorrerá maior afinidade aos OPs quando advir alterações conformacionais simulados por meio de Dinâmica Molecular.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. "Basic local alignment search tool." **Journal of Molecular Biology**. 215:403-410, 1990.

AMARAL, E.H. **Resíduos de agrotóxicos organofosforados: validação de métodos de cromatografia a gás e quantificação em produtos agrícolas**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 134 p.

BAKER, N. A., SEPT, D., JOSEPH, S., HOLST, M.J., McCAMMON, J. A. **Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome**. Baker Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Aug 28;98(18):10037-41.

BAKER, D.; SALI, A. Protein structure prediction and structural genomics. **Science**, v. 294, p. 93–96, 2001.

BAKER, N. A. *et al.* The adaptive multilevel finite element solution of the poisson - boltzmann equation on massively parallel computers. **IBM Journal of Research and Development**, v. 45, p. 427–438, 2001.

BEN-DAVID, M. *et al.*, Catalytic Versatility and Backups in Enzyme Active Sites: The Case of Serum Paraoxonase 1. **Journal of Molecular Biology**, 418, p. 181–196, 2012.

BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235–242, 2000.

BLACK, R. M.; HARRISON, J. M. **The Chemistry of Organophosphorus Compounds**; Hartley, F. R., ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 1996.

BOMBARDI, L. M., - **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia** - São Paulo: FFLCH – USP 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da União, Ato nº 17. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/67956251. Último acesso em: 18 de julho de 2020

CALDAS, L. Q. A. **Intoxicações exógenas agudas por carbamatos e organofosforados, compostos bipirilídicos e piretróides**. Niterói, 43 p, 2000.

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 de Química**, Vol 8, No. 3, p. 739-766, 2016.

COLASSO, C.; AZEVEDO, F. A.; Riscos da utilização de Armas Químicas. Parte I - Histórico. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 137- 172, 2011.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, 1993.

COSTA, L.G., *et al.*, Functional genomics of the Paraoxonase (PON1) polymorphisms Effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease and drug metabolism. **Annu Rev Med.**, 54: 371-92, 2003.

COSTA, L.G., *et al.*, Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. **Toxicology** (2012).

DOS SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; COSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v.30, n.1, p.159-170, 2007.

HAREL, M. *et al.* Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. **Nature Structural & Molecular Biology**, Vol. 11, Number 5, 2004.

KORBES, D. **Toxicidade de agrotóxicos organofosforados no sistema auditivo periférico de cobaias: Estudo anatômico e funcional**. Santa Maria, RS, Brasil 2009.

LA DU, B.N. Future studies of low-activity PON1 phenotype subjects may reveal how PON1 protects against cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2004;23;1317-8.

LUTHY, R., BOWIE, J.U., EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, 356:83–85, 1992.

MAGALHÃES, C. S., ALMEIDA, D. M., BARBOSA, H. J. C., DARDENNE, L. E. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, vol. 289, pp. 206–224, Dec. 2014.

MATA, D.V. *et al.*, Investigation of Evolved Paraoxonase-1 Variants for Prevention of Organophosphorous Pesticide Compound Intoxication. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. United States Army Medical Research Institute of Chemical Defense, 2014.

NACHON, F. *et al.*, Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers, *Chemico-Biological Interactions*, 2013.

OGA, S., 2003. **Fundamentos De Toxicologia**, 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 474p.

PETRONILHO, E. C.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos. **Rev. Virtual Quim.** Vol 6, No. 3, p 671-686, 2014.

PERES, F e MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional** 2012, 37, 17.

RAMACHANDRAN, G. N., RAMAKRISHNAN, C., SASISEKHRAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**. 7:95–99, 1963.

RAINWATER, D.L. *et al.*; Determinants of variation in human serum Paraoxonase activity. **Heredity**, 102:147-52. 2009.

SILVA, G.R.; BORGES, I.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; CASTRO, A.T. **Defesa química: histórico, classificação dos agentes e ação dos neurotóxicos**. Química nova. 2012, 35, 10, 2083.

SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using clustal omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, p. 539, 2011.

WEBB, B., SALI. A. **Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller**. **Current Protocols in Bioinformatics**, 54, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.37, 2016.