

Ensayos

Evaluación in silico de insecticidas inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE)

Resumen

La toxicidad de insecticidas organofosforados y carbamatos en insectos y mamíferos está determinada por factores que pueden afectar desde la absorción, hasta la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que degrada la acetilcolina neurotransmisor importante en la conducción de los impulsos eléctricos en el cerebro provocando la muerte. En este estudio se evaluaron las características físico-químicas de algunos insecticidas mediante modelado molecular. Así como, la interacción que producen con esta enzima usando estudios *in silico*, los resultados muestran una interacción favorable entre los insecticidas 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-metil carbamato (Carbofurano), S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tio-oxamidato (Oxamil), Pentacloronitrobenzono (Interguzan) y el O,S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos) y la enzima (AChE).

Abstract

The toxicity of the organophosphorous and carbamate insecticides for insects and mammals is determined by factors that can affect anything from absorption to the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), an enzyme that degrades the acetylcholine, an important neurotransmitter for conducting electrical impulses in the brain, thus leading to death. In this study, the physicochemical characteristics of certain insecticides are evaluated through molecular modeling, as well as the interaction they produce with this enzyme using *in silico* studies. The results show a favorable interaction among the insecticides 2,2-dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl methylcarbamate (Carbofuran), Methyl 2-(dimethylamino)-N-[(methylcarbamoyl)oxy]-2-oxoethanimidothioate (Oxamyl) Pentachloronitrobenzene (Interguzan), O,S-Dimethyl phosphoramidothioate (Methamidophos) and the enzyme AChE.

Résumé

La toxicité des insecticides organophosphorés et des carbamates chez les insectes et les mammifères est déterminée par des facteurs pouvant affecter depuis l'absorption et jusqu'à l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme qui dégrade l'acétylcholine, neurotransmetteur important dans la conduites de impulsions électriques dans le cerveau, provoquant la mort. Dans cette étude, on a évalué les propriétés physico-chimiques de quelques insecticides à l'aide du modèle moléculaire, ainsi que l'interaction qu'ils produisent avec cette enzyme en utilisant des études *in silico*. Les résultats montrent une interaction favorable entre les insecticides 2,2-diméthyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl méthylcarbamate (Carbofurano), méthyl N,N'-diméthyl-N [(méthylcarbamoloxi) oxy]-1-thioxamimidate (Oxamil), Pentacloronitrobenzène (Interguzan) et le O,S-diméthyl phosphoramidothioate (Méthamidophos) et l'enzyme (AChE).

Verónica Castro Bear¹,
Juan Saulo González González²,
José Alfredo Sánchez Meraz²,
Arleth Miranda López²,
Andrea Mora Reyes²,
Oscar Zuñiga Lemus²

Palabras Clave: Acetilcolina, Acoplamiento molecular, Inhibición enzimática, Insecticidas,

Introducción

Las propiedades de los organofosforados (OPs) y los carbamatos fueron descubiertas en 1930, pero fue hasta 1940 que se les dio el uso como pesticidas, su uso se incrementó en 1970 con la producción del DDT. Tanto carbamatos como OPs tienen un tiempo de vida en el ambiente que puede ser de días hasta meses, sin embargo su descomposición es acelerada por altas temperaturas o el aumento en el pH (Amdur, Doull, Klaassen 1991; Crommentuijn et al, 2000; Brujin et al, 2013).

Los OPs y carbamatos son compuestos usados ampliamente en el mundo como insecticidas, herbicidas, nematocidas, aracnicidas, fungicidas, rodenticidas, avicidas y repelentes de pájaros en todas sus fases de desarrollo, la emisión de OPs puede ocurrir en la producción, formulación

¹Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,

²Universidad de la Cañada

uso y aplicación (NRC,1993). La toxicidad de los OPs y carbamatos es debida a la alteración del sistema nervioso (SN), siendo el mecanismo de acción la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE, colina hidrolasa, EC 3.1.1.7) la cual se encuentra en diversas especies, incluyendo los humanos (Ecobichon y Joy 1994;Ward y Mundy 1996; Klepper et al, 1998; Bigbee et al, 1999; Azaroff 1999), esta enzima cataliza la hidrólisis de la acetilcolina (ACh) hacia colina y ácido acético (Fukuto 1990; Leibsony Lifshitz, 2008). La acetilcolina es uno de los neurotransmisores involucrados en la transmisión del impulso nervioso a células efectoras colinérgicas, sinápticas y neuromusculares (Groner et al, 2007) de tal forma que la inhibición de la AChE puede paralizar el SN y conducir a muerte usualmente por paro respiratorio (Mineau et al, 1994; Mineau et al, 1996; MacPhail y Glowa, 1999). Estos efectos adversos han sido documentados en humanos, animales de laboratorio y diversas especies (acuáticas y terrestres) (Ecobichon et al, 1994; Mineau, 1991; Simcox et al, 1995).

Por otro lado, los organoclorados como el pentacloronitrobenceno, presentan diversos efectos tóxicos en humanos como son infertilidad, carcinogenicidad, neurotoxicidad e inmunotoxicidad entre otros siendo la carcinogenicidad e infertilidad los efectos más estudiados en este compuesto (Skakkebaek et al, 2008; Teilmann et al, 2002; Toft et al, 2005).

Diversos estudios usando QSAR así como estudios de Acoplamiento Molecular han mostrado la importancia de la hidrofobicidad y electrostática que tienen organofosforados y metamidofos, así como diversos inhibidores de la AChE para inhibir esta enzima (Bernard et al, 1999; Hirashima et al. 2000; Spassova y Singh 2001), estos estudios concluyen que los sitios aromáticos y los grupos catiónicos salientes de los inhibidores están orientados hacia el sitio activo lo que favorece la interacción con la AChE (Yazal et al, 2001).

Por otro lado, hay reportes que indican que el sitio catalítico de la AChE está formado por un sitio aniónico periférico (PAS) formado por tres aminoácidos principales Trp279, Tyr70 y Asp72, así como un subsitio aniónico catalítico (CAS) el cual ha sido propuesto como el lugar de reconocimiento de la acetilcolina, estabilizado principalmente por las interacciones π - π con el Trp84, además de interactuar con los aminoácidos: Glu199 y Phe330. Estos aminoácidos son

importantes ya que las interacciones reportadas entre inhibidores de la AChE se han visto facilitadas por la presencia de grupos fenilo e indol del Trp84 y Trp279 en el sitio catalítico lo que resulta en la inhibición de la enzima. (Kishore et al, 2012; Kryger et al, 1999)

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue realizar una caracterización fisicoquímica de algunos de los insecticidas más utilizados en la agricultura, así como contribuir con el conocimiento de cuáles son los principales aminoácidos que interactúan entre la enzima acetilcolinesterasa y su ligando, y de esta manera contribuir con el estudio del mecanismo de acción de los insecticidas 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (carbofurano), S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tio-oxamidato (Oxamil), Pentacloronitrobenceno (Interguzan) y 0-S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos) usando para ello modelado molecular tomando como control del estudio la Tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina), el cual es un compuesto aprobado por la FDA en 1993 para el tratamiento de Alzheimer que se sabe disminuye la degradación de acetilcolina en el espacio intersináptico por inhibición enzimática de la AChE (Kozurkova et al, 2001; Sarter et al, 2005).

Desarrollo Metodología

Minimización de las estructuras

La estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa a evaluar se obtuvo del Protein Data Bank con código de identificación 1ACJ1ACJ (www.pdb.org). Para llevar a cabo el acoplamiento molecular, las estructuras moleculares minimizadas de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (Tacrina) y los insecticidas el 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (carbofurano), S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tio-oxamidato (Oxamil), Pentacloronitrobenceno (Interguzan) y el 0-S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos) (Fig. 1) se generaron mediante minimización a 300 K por 10ps, empleando como campo de fuerza CHARMM22-PROT mediante el software VEGA ZZ ver 3.0.1, para posteriormente optimizarlas hasta un gradiente menor o igual a 0.01kcal/Å empleando un análisis conformacional en gradiente conjugado con Ammp. Las propiedades calculadas incluyen el peso molecular, la energía total (AM1_E), la solubilidad en agua (Log

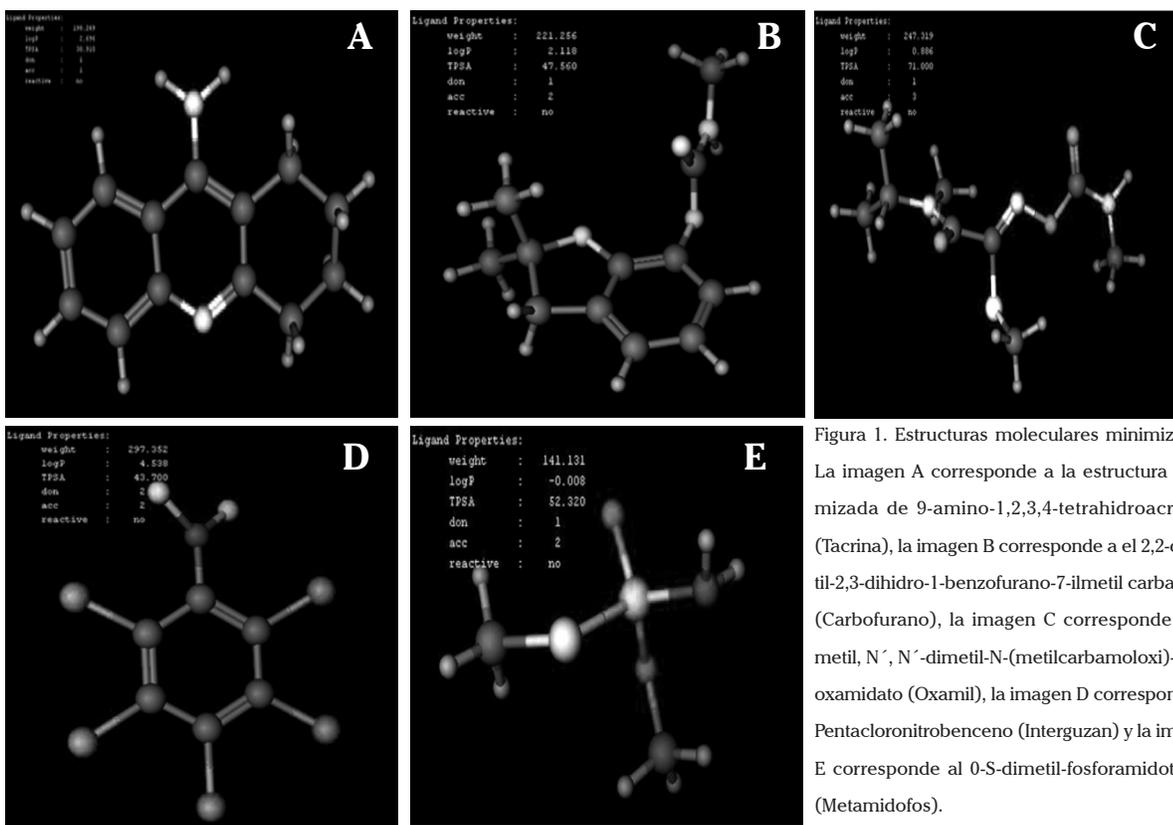


Figura 1. Estructuras moleculares minimizadas. La imagen A corresponde a la estructura minimizada de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (Tacrina), la imagen B corresponde a el 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (Carbofurano), la imagen C corresponde al S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tiooxamidato (Oxamil), la imagen D corresponde al Pentacloronitrobenceno (Interguzan) y la imagen E corresponde al 0-S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos).

S), el coeficiente de partición octanol:agua (LogP), el área topológica de la superficie polar (TPSA), el Coeficiente de Refractividad Molar (CMR) y los orbitales de mayor y menor energía (HOMO-LUMO) obtenidos por medio del software Molecular Operating Environment (MOE) ver 2010.10.

Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular se realizó usando como molde la enzima acetilcolinesterasa obtenida del Protein Data Bank (PDB), la cual reporta como ligando el 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (Tacrina) en el sitio activo, compuesto que fue utilizado como control positivo. El dominio catalítico de la enzima descargada presenta una resolución de 2.8Å, el sitio activo fue determinado mediante el Site-Finder del programa MOE ver 2010.10 y comparado con reportes previos (Silman y Sussman, 2008).

Para llevar a cabo el análisis conformacional, se usó un método estocástico, basado en el protocolo de acoplamiento rígido-rígido, seguido de un rígido-flexible y flexible-flexible. Finalmente, el complejo enzima-ligando fue visualizado con MOE.

Usando este mismo protocolo, se obtuvieron los datos con los insecticidas el 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (carbofurano), S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tiooxamidato (Oxamil), Pentacloronitrobenceno (Interguzan) y el 0-S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos).

Resultados

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos se muestran en la tabla 1, en todos los casos las energías totales son menores a los -3500.00kcal/mol indicando la estabilidad química que poseen estos compuestos, los datos obtenidos en los coeficientes de solubilidad nos muestran compuestos solubles en solventes orgánicos con excepción de los Metamidofos los cuales poseen mayor solubilidad en agua, los valores del área topológica de superficie polar (TPSA) varían de acuerdo al número de sustituyentes de cada molécula siendo el más grande el del Oxamil con un valor de 71.62 ± 4.981 debido a la presencia de las aminas, los carbonilos y el azufre en su estructura, seguido del Metamidofos por la presencia de oxígeno, azufre, nitrógeno y fosfato en la molécula con un valor de 53.32 ± 0.9434 , los valores obtenidos de HOMO

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos: Peso molecular (PM), energía total (AM1_E), Solubilidad en agua (Log S), Coeficiente de partición octanol: agua (Log P), Coeficiente de Refractividad Molar (CMR), área topológica de superficie polar (TPSA), orbital más ocupado y orbital menos ocupado (HOMO y LUMO).

Compuesto	PM (g/mol)	AM1_E (kcal/mol)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Log S	Log P	CMR	TPSA
9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (Tacrina)	198.269	-47319.22 ± 0.01	-9.438 ± 0.00087	-3.376725 ± 0.00005	2.78	2.696	6.1109	38.91 ± 0.3447
Pentacloronitrobenzeno (Interguzan)	296.344	-8044.94 ± 0.00093	-14.9328 ± 0.00057	-12.093 ± 0.00057	4.9383	4.612	5.4703	40.54 ± 0.6489
2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (Carbofurano)	221.256	-67119.91 ± 0.1912	-8.8767 ± 0.0024	0.2063 ± 0.0022	2.4609	2.118	6.0419	47.56 ± 2.826
0-S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos)	141.131	-35487.6 ± 0.996	-9.555 ± 0.096	-0.6252 ± 0.0357	-0.5465	-0.008	3.2997	53.32 ± 0.9434
S - m e t i l , N ´ , N ´-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tio-oxamidato (Oxamil)	247.319	-72898.8 ± 2.069	-8.908 ± 0.0125	-0.08764 ± 0.0284	-2.0553	0.886	6.3651	71.62 ± 4.981

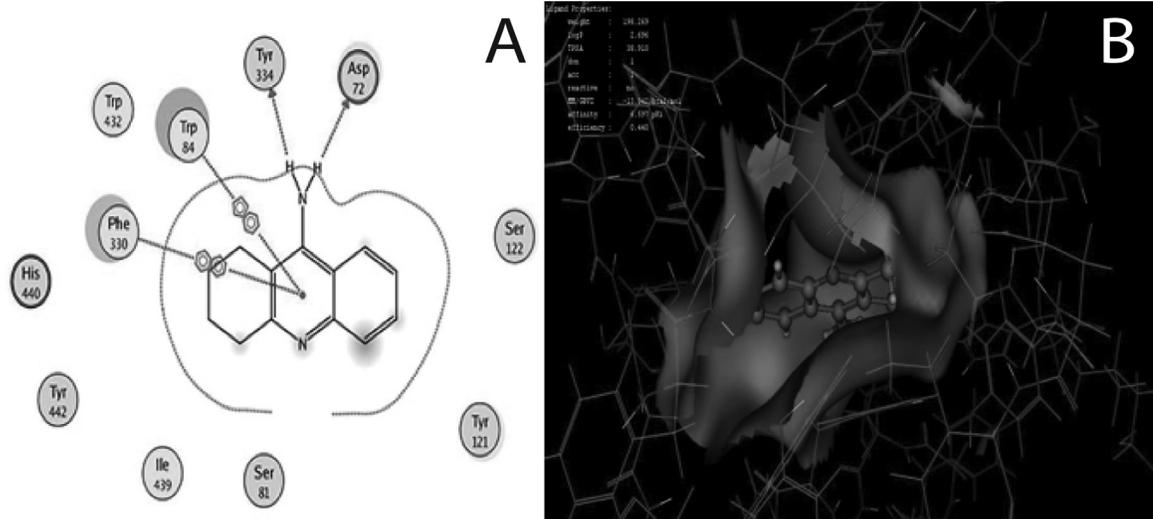


Figura 2. Acoplamiento molecular. Interacciones entre los aminoácidos del sitio activo de la acetilcolinesterasa y el 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (Tacrina); la imagen A muestra los aminoácidos que interaccionan entre la acetilcolinesterasa y la Tacrina. La imagen B corresponde al contacto Gaussiano en la superficie de la acetilcolinesterasa y la Tacrina; el verde indica el área hidrofóbica, el púrpura las áreas de formación de puentes de hidrógeno y el azul el área polar.

y LUMO nos permiten predecir la excitabilidad que poseen estas moléculas, lo cual es parte importante de su reactividad para interactuar a nivel biológico, en todos los casos se muestran energías negativas

comparables con la energía arrojada por la Tacrina, el Oxamil arrojó los valores menos reactivos con -8.908 ± 0.0125 para la energía HOMO y -0.08764 ± 0.0284 en la energía LUMO, el caso del Interguzan es el que

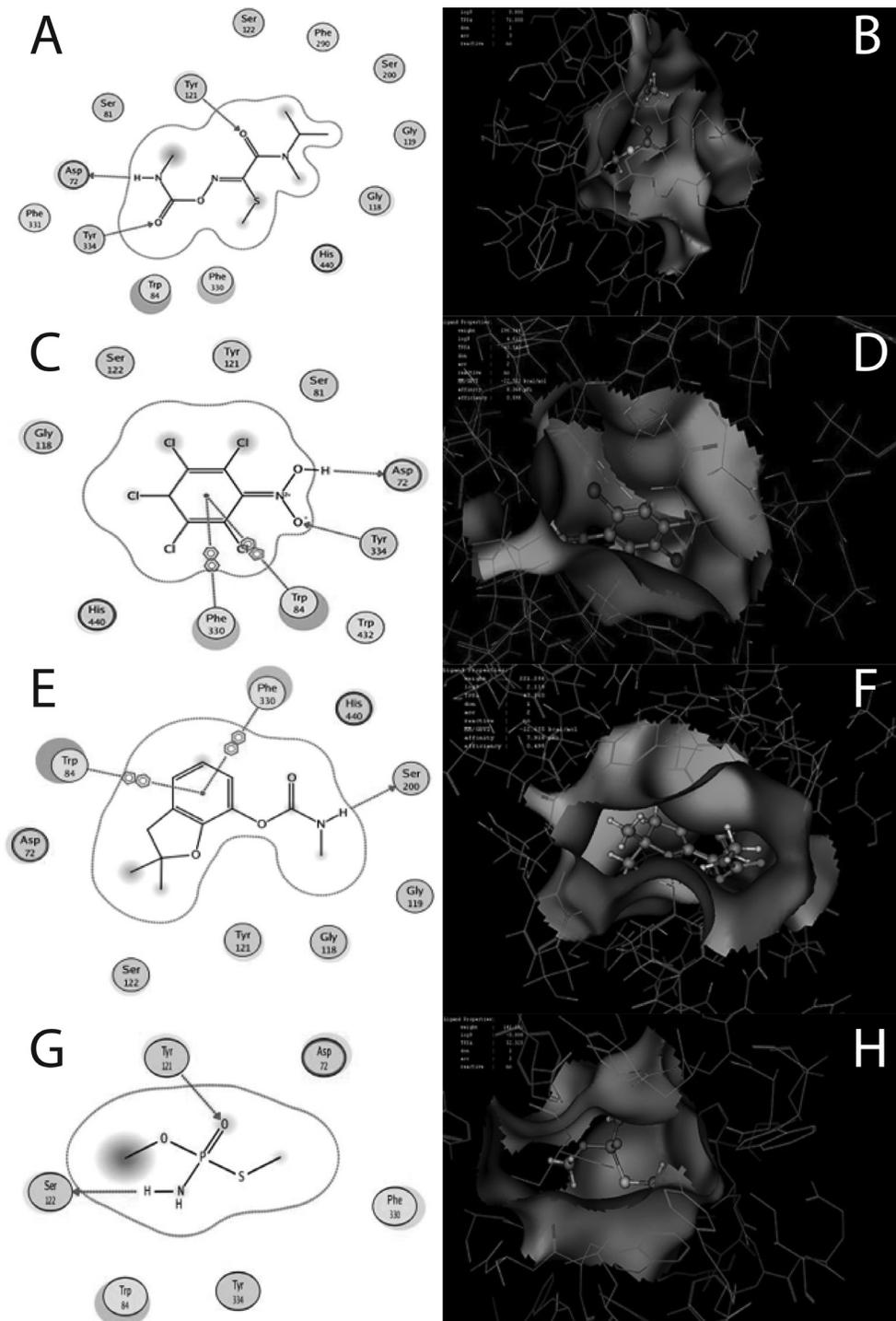


Figura 3. Acoplamiento molecular. Interacciones entre los aminoácidos del sitio activo de la acetilcolinesterasa y los insecticidas estudiados. La imagen A muestra los aminoácidos que interaccionan entre la acetilcolinesterasa y el S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoilo)-1-tiooxamidato (Oxamil). La imagen B corresponde al contacto Gaussiano en la superficie de la acetilcolinesterasa y el Oxamil. La imagen C muestra los aminoácidos que interaccionan entre la acetilcolinesterasa y el Pentacloronitrobenzeno (Interguzan). La imagen D corresponde al contacto Gaussiano en la superficie de la acetilcolinesterasa y el Interguzan. La imagen E muestra los aminoácidos que interaccionan entre la acetilcolinesterasa y el 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (Carbofurano). La imagen F corresponde al contacto Gaussiano en la superficie de la acetilcolinesterasa y el Carbofurano. La imagen G muestra los aminoácidos que interaccionan entre la acetilcolinesterasa y el 0-S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos). La imagen H corresponde al contacto Gaussiano en la superficie de la acetilcolinesterasa y el Metamidofos; el color verde indica el área hidrofóbica, el púrpura las áreas de formación de puentes de hidrógeno y el azul el área polar.

se presenta como el más reactivo ya que se obtuvieron valores de HOMO/LUMO de -14.9328 ± 0.00057 / -12.093 ± 0.00057 respectivamente, superando aún los valores arrojados de la Tacrina (HOMO -9.438 ± 0.00087 / LUMO -3.376725 ± 0.00005).

Los resultados del acoplamiento molecular entre la enzima acetilcolinesterasa y los insecticidas 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (carbofurano), S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tio-oxamidato (Oxamil), Pentacloronitrobenzeno (Interguzan) y el 0-S-dimetilfosforamidotidato (Metamidofos) con MOE (ver 2010.10) muestran un posible reacomodo entre los insecticidas evaluados (ligando) y el sitio catalítico de la enzima acetilcolinesterasa (receptor) indicando una probable interacción entre las estructuras estudiadas. Esta interacción puede causar la inhibición de la enzima, ya que se sabe que el mecanismo de acción de los carbamatos y organoclorados es la inhibición de la AChE (Fukuto, 1990).

Los datos muestran que los aminoácidos que presentan interacción entre la enzima y la Tacrina son Trp84 y Phe 330 por la formación de los enlaces π - π entre los anillos bencénicos de los aminoácidos y los anillos de la Tacrina, así como una interacción del grupo amino con los aminoácidos Tyr334 y Asp72 (Fig. 2) lo cual concuerda con reportes previos (Szymanski, et al., 2013).

Al realizar el acoplamiento entre la enzima y los insecticidas los resultados mostraron una interacción entre el Oxamil y la enzima entre los aminoácidos Tyr 122, Asp 72 y Tyr334 por formación de puentes de hidrógeno, en el caso de los aminoácidos de Tyr interaccionan con los átomos de oxígeno del Oxamil en tanto la Asp interaccionó con el grupo amina

(Figura 3A), en el caso del Pentacloronitrobenzeno la interacción se da de manera similar que la Tacrina, presentando formación de enlaces π - π entre los anillos aromáticos (Trp84 yPhe330) esta interacción está mediada por formación de puentes de hidrógeno entre los aminoácidos Asp 72 y la Tyr334 con el grupo nitro del pentacloro (Fig. 3 C), el grupo amina de la estructura del carbamato (Carbofurano) interacciona con el aminoácido Ser200 de la enzima, así mismo se observa interacción entre la Phe330 y Trp84 formando enlaces π - π con el anillo aromático del compuesto (Fig. 3 E), finalmente para el caso del Metamidofos los aminoácidos que interaccionan son Tyr121 y Ser122 mediante formación de puentes de hidrógeno con el átomo de Oxígeno y el grupo amino de la estructura (Figura 3 G).

Las figuras 3 B, D, F y H corresponden al contacto Gaussiano en el sitio activo de la enzima con los insecticidas Carbofurano, Oxamil, Interguzan y Metamidofos respectivamente en todos los casos es posible apreciar que este contacto se da predominantemente en las zonas hidrofóbicas de la enzima marcadas en color verde, mientras el contacto con las áreas polares marcadas en color morado y la formación de puentes de hidrógeno marcadas en color azul es menor con todos los ligandos, todos estos contactos favorecen la interacción entre la enzima y su ligando, es importante resaltar que este mismo efecto es posible apreciarlo en el acoplamiento realizado con la Tacrina (Figura 2B).

Es importante señalar que los resultados muestran que los insecticidas evaluados en este estudio presentan una mayor afinidad por la acetilcolinesterasa que la Tacrina, obteniendo valores que van de 7.634 el más bajo en el caso del Metamidofos hasta 9.393

Tabla 2. Datos comparativos de la Energía libre de Gibbs (ΔG^0), Afinidad y eficiencia de los compuestos estudiados. Energías de los complejos con la acetilcolinesterasa y los insecticidas computados con MOE.

COMPUESTO	ΔG^0	Afinidad (pKi)	Eficiencia
9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (Tacrina)	-13.942	6.597	0.440
0-S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos)	-10.921	7.634	1.091
Pentacloronitrobenzeno (Interguzan)	-22.753	8.366	0.598
2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (Carbofurano)	-18.395	9.393	0.587
S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tio-oxamidato (Oxamil)	-16.785	8.049	0.503

que corresponde al Carbofurano, comparado con la Tacrina el cual fue de 6.597, por lo que es posible considerarlos como moléculas con buena afinidad (pK_i) por esta enzima (Tabla 2), de la misma manera todos presentan una eficiencia superior a 50% y una energía libre de Gibbs negativa de -10.921 para Metamidofos, de -22.753 para el Pentacloro, -18.395 para el Carbofurano, y -16.785 para el Oxamil, por lo cual es posible que estos insecticidas se unan a la acetilcolinesterasa de manera similar que la Tacrina ya que el estudio con este inhibidor arrojó una energía libre de Gibbs de -13.942 y una afinidad de 6.597 (Tabla 2).

Los datos anteriores nos permiten proponer a los aminoácidos Asp72, Tyr334, Trp84 y Phe330 como componentes importantes en la interacción entre la acetilcolinesterasa e insecticidas ya que son estos quienes presentan mayor interacción en los acoplamientos moleculares realizados en el sitio activo de la enzima.

Conclusiones

En el presente trabajo se estudió la capacidad de reconocimiento entre la acetilcolinesterasa y diversos insecticidas usados en la agricultura y que se sabe causan la inhibición de esta enzima generando efectos neurotóxicos variados. Los parámetros fisicoquímicos obtenidos indican que los compuestos 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (Tacrina), Pentacloronitrobenzoceno (Interguzan) y 2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (Carbofurano) poseen una baja solubilidad en agua sin embargo tienen la capacidad de pasar a través de membranas celulares, por lo cual pueden ser catalogados dentro del grupo II de la clasificación biofarmacéuticas (BSC) como compuestos con alta permeabilidad y baja solubilidad, sin embargo el 0-S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos) y el S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoilo)-1-tio-oxamidato (Oxamil) pueden ser catalogados dentro del grupo I de la clasificación biofarmacéuticas (BSC) como moléculas de alta solubilidad y con alta permeabilidad (Amidon, et al., 1995). De acuerdo a los datos anteriores todos los compuestos pueden atravesar membranas celulares y en este caso por su liposolubilidad también barrera hematoencefálica lo que se relaciona con sus efectos tóxicos.

Estudios previos indican que los carbamatos inhiben la AChE por interacción del grupo carbamoilo

con la enzima teniendo como resultado la inhibición enzimática (Eddleston, et al., 2004), lo cual concuerda con nuestros resultados, sin embargo en este trabajo reportamos además que esta interacción también puede estar mediada por enlaces tipo π - π cuando los carbamatos en su estructura poseen grupos bencénicos como lo muestra la Figura 3E.

Algunos de los insecticidas más ampliamente utilizados en la historia incluyen los organoclorados, los cuales dentro de sus características físicas presentan baja solubilidad en agua pero alta solubilidad en lípidos. Además de ser compuestos muy resistentes a la degradación, debido a que persisten en el ambiente por periodos grandes, lo cual se observa en los parámetros fisicoquímicos obtenidos mediante MOE (tabla 1), se puede apreciar que este compuesto posee los valores más negativos de HOMO (-14.9328 \pm 0.0057) y LUMO (-12.093 \pm 0.0057) indicando su alta reactividad así como su gran estabilidad alcanzando valores hasta -8044.49kcal/mol, esta estabilidad es la que aumenta su toxicidad al estar en el ambiente por periodos mayores; aunado al alto valor de energía de Gibbs obtenido por el acoplamiento sugiriendo una gran afinidad por esta enzima.

Nuestros resultados muestran que el pentacloronitrobenzoceno presenta una interacción muy similar con la Tacrina con la acetilcolinesterasa, lo cual está relacionado con el tipo de estructura que presenta, ya que el Interguzan posee un anillo de seis átomos de carbono así como un sustituyente nitro, presentando una estructura muy similar a la Tacrina; que presenta un anillo de seis carbonos y una amina, lo anterior favorece la interacción observada en el acoplamiento entre los ligandos y la AChE, sin embargo los datos de afinidad, eficiencia y energía libres arrojados en este estudio siguieron una mayor afinidad del Interguzan por la AChE que entre la Tacrina y la AChE (Tabla 2), demostrando la capacidad de reconocer la AChE y de este reconocimiento se pueden entender los efectos secundarios como son: depresión seguida por excitabilidad, temblores y finalmente convulsiones (Leibson et al, 2008)(Coats, 1990).

Los organofosforados presentan reactividad por la presencia del átomo de fósforo (P) como parte central en la actividad biológica de estos OPs, el átomo de fósforo es considerado como no reactivo y depende de la presencia del doble enlace con el oxígeno así

como de la unión de un grupo electronegativo, tales como el nitrógeno o azufre (Figura 1E) que pueden ser convertidos a un estado electrofílico aumentando la reactividad del compuesto (Fukuto, 1990), permitiendo que el fósforo se convierta a un estado positivo de carga, lo cual genera la reactividad del insecticida, como se aprecia en la Figura 3E los átomos más reactivos de este insecticida son el nitrógeno y el oxígeno de la molécula, los cuales interactúan con la Ser122 y Tyr121 respectivamente, siendo este compuesto el que posee la menor afinidad de los cuatro insecticidas estudiados concordando con la menor energía libre de Gibbs obtenida por el acoplamiento (Tabla 2). Finalmente, los datos del acoplamiento molecular sugieren una interacción entre la enzima AChE (receptor) y los insecticidas evaluados en el sitio activo de la enzima. Inicialmente se reconstruyó el sitio activo de la enzima usando el programa MOE y modeló la conformación más estable de los insecticidas, mediante el programa VEGA ZZ y MOE. Dicho acoplamiento mostró que los insecticidas estudiados poseen una afinidad por la AChE similar a la Tacrina.

Con la información obtenida en este estudio se puede concluir que los insecticidas Pentacloronitrobenzeno (Interguzan), 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato (Carbofurano), 0-S-dimetil-fosforamidotidato (Metamidofos) y S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tio-oxamidato (Oxamil) poseen una mayor afinidad a la AChE que la Tacrina, permitiendo considerar a estos insecticidas como moléculas con capacidad de inhibir esta enzima, por lo cual se propone a los insecticidas carbamatos y organofosforados como compuestos que pueden interactuar e inhibir a la AChE, pero además en este estudio sugerimos al pentacloronitrobenzeno perteneciente a la familia de los organoclorados, como molécula capaz de generar una interacción favorable con la AChE y la inhibición de esta enzima; proponiendo como mecanismo de acción adicional a la inhibición de los canales de cloro la inhibición de la AChE como parte del mecanismo de acción para este insecticida.

El acoplamiento molecular produjo una serie de conformaciones con los ligandos, lo que representa los diferentes modos de interacción dependiendo de la estructura evaluada. Sobre la base de tales orientaciones y el conjunto de interacciones que fueron

identificados entre los ligandos y los residuos de la proteína en el sitio activo, se puede sugerir que los compuestos estudiados (0-S-dimetil-fosforamidotidato, Pentacloronitrobenzeno, 2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofurano-7-ilmetil carbamato, S-metil, N', N'-dimetil-N-(metilcarbamoloxi)-1-tio-Oxamidato) son capaces de actuar como bloqueadores de la entrada del sustrato iónico (ACh) en el sitio activo de la AChE inhibiendo su función. Además, podemos decir que los principales aminoácidos involucrados en este reconocimiento molecular entre los insecticidas y la acetilcolinesterasa son: Asp72, Tyr334, Trp84 y Phe330 y esta interacción es probablemente la responsable de la inhibición enzimática observada en estudios *in vivo* 

Bibliografía

- Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, D.C. (1991). *Casarett and Doull's Toxicology, The basic science of poisons eds.* Elmsford, N.Y: Pergamon Press.
- Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah V.P., Crison, J.R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res. Vol. 12.* 413-20.
- Azaroff, L.S. (1999). Biomarkers of exposure to organophosphorous insecticides among farmers' families in rural El Salvador: factors associated with exposure. *Environ. Res. Vol. 80.* 138-147.
- Bernard, P., Kireev, D. B., Chretien, J. R., Fortier, P. L., Coppet, L. (1999). Automated docking of 82 N-benzylpiperidine derivatives to mouse acetylcholinesterase and comparative molecular field analysis with 'natural' alignment. *J. Comput. Aided. Mol. Des. Vol. 13,* 355-371.
- Bigbee, J.W., Sharma, K.V., Gupta, J.J., Dupree, J.L. (1999). Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ. Health. Perspect. Vol. 107(1).* 81-87.
- Brujin, J.H.M., Jager, D.T., Kalf, D.F., Mensink, B.J.W.G., Montforts, M.H.M.M., Sjim, D.T.H.M., Smit, C.E., van Vlaardigen, P.L.A., Verbruggen, E.M.J., van Wesel, A.P. Guidance Document on deriving Environmental Risk Limits The Netherlands. RIVM report no. 679102044 [consulta el 09 de Diciembre 2013]; <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/601501012.pdf>

- Coats, J.(1990). Mechanisms of Toxic Action and Structure Activity Relationships for Organochlorine and Synthetic Pyrethroid Insecticides. *Environ. Health. Perspect. Vol. 87.* 255-262.
- Crommentuijn, C., Sijm, D., Bruijn, J. de, Leeuwen, K van., Plassche, E. (2000). Maximum permissible and negligible concentrations for some organic substances and pesticides. *J. Environm. Management. Vol. 58.* 297-312.
- Ecobichon, D.J., Joy, R.M. (1994). *Pesticides and Neurological Diseases*. Boca Raton: CRC Press.
- Eddleston, M., Dawson, A., Karalliedde, L., Dissanayake, W., Hittarage, A., Azher, S., Buckley, N.A. (2004). Early management after self-poisoning with an organophosphorus or carbamate pesticide a treatment protocol for junior doctors. *Crit. Care. Vol. 8(6).* 391-397.
- Fukuto, R. (1990). Mechanism of action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environ. Health. Perspect. Vol. 87.* 245-254.
- Groner, E., Ashani, Y., Schorer-Apelbaum, D., Sterling, J., Herzig, Y., Weinstock, M. (2007). The kinetics of inhibition of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by two series of novel carbamates. *Mol. Pharmacol. Vol. 71.* 1610-1617.
- Hirashima, A., Kuwano, E., Eto, M. (2000). Docking study of enantiomeric fonofos oxon bound to the active site of *Torpedo californica acetylcholinesterase*. *Bioorg. Med. Chem. Vol. 8,* 653-656.
- Kishore, P., Sharma, A., Piplani, P., Akkinapally, R.A. (2012). Molecular docking and receptor-specific 3D-QSAR studies of acetylcholinesterase inhibitors. *Mol. Divers. Vol. 16(4):*803-823
- Klepper, O., Bakker, J., Traas, T.P., Van de Meent, D.(1998). Mapping the potentially affected fraction (PAF) of species as a basis for comparison of ecotoxicological risks between substances and regions. *J. Hazard. Mater. Vol. 61.* 337-344.
- Kozurkova, M., Hamulakova, S., Gazova, Z., Paulikova, H., Kristian, P. (2011). Neuroactive multifunctional tacrine congeners with cholinesterase, anti-amyloid aggregation and neuroprotective properties. *Pharmaceuticals. Vol. 4.* 382-418.
- Kryger, G., Silman, I., Sussman, J.L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure. Vol. 15(3):*297-307.
- Leibson, T., Lifshitz, M. (2008). Organophosphate and Carbamate Poisoning: Review of the Current Literature and Summary of Clinical and Laboratory Experience in Southern Israel. *Toxicol. Vol. 10.* 767-770
- MacPhail, R.C., Glowa, J.R. (1999). Quantitative risk assessment in neurotoxicology: Past, present and future. In: *Neurotoxicology. New York: Taylor and Francis.*
- Mineau, P. (1991). *Cholinesterase-inhibiting Insecticides, Their impact on wildlife and the environment, chemicals in agriculture*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishing.
- Mineau, P., Boersma, D.C., Collins, B. (1994). An analysis of avian reproduction studies submitted for pesticide registration. *Ecotoxicol. Environ. Safety. Vol. 29.* 304-329.
- Mineau, P., Collins, B.T., Baril, A. (1996). On the use of scaling factors to improve interspecies extrapolation of acute toxicity in birds. *Reg. Toxicol. Pharmacol. Vol. 24.* 24-29.
- NRC. (1993). *Pesticides in the diets of infants and children*. Washington DC: National Research Council, Committee on Pesticides in the Diets of Infants and Children, Board on Agriculture and Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences, National Academy Press.
- Sarter, M., Nelson, C.L., Bruno, J.B. (2005), Cortical cholinergic transmission and cortical information processing in schizophrenia. *Schizophr. Bull. Vol. 31.* 117-138.
- Silman, I., Sussman, L.J. (2008). Acetylcholinesterase: How is structure related to function?; *Chem. Biol. Interact. Vol. 175.* 3-10.
- Simcox, N.J., Fenske, R.A., Wolz, S.A., Lee, I.C., Kalman, D.A. (1995). Pesticides in household dust and soil: exposure pathways for children of agricultural families. *Env. Health Perspect. Vol. 103.* 1126-1134.
- Skakkebaek, N., Rajpert-De M., Main, K. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly

- common developmental disorder with environmental aspects. *Human reproduction*. Vol. 16 (5). 972-978
- Spassova, D.P., Singh, A.K (2001). QSAR for Acetylcholinesterase Inhibition and Toxicity of Two Classes of Phosphoramidothioates, SAR QSAR Environ. Res. Vol. 11 (4-5): 453-471.
- Szymanski, P., Skibinski, R., Inglot, T., Bajda, M., Jonczyk, J., Malawska, B. Mikiciuk-Olasik, E. (2013). New Tacrine Analogs as Acetylcholinesterase Inhibitors Theoretical Study with Chemometric Analysis. *Molecules*. Vol.18. 2878-2894.
- Teilmann, G., Juul, A., Skakkebaek, N., Toppari, J. (2002). Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. Vol. 16(1). 105-121.
- Toft, G., Axmon, A., Giwercman, A., Thulstrup, A.M., Rignell-Hydbom, A., Pedersen, H.S., Ludwicki, J.K, Zvezday, V., Zinchuk, A., Spano, M., Manicardi, G.C., Bonefeld-Jørgensen, E.C., Hagmar, L., Bonde, J. (2005). Fertility in four regions spanning large contrasts in serum levels of widespread persistent organochlorines: a cross sectional study. *Environ Health*. Vol. 4. 26-37.
- Ward, T.R., Mundy, W.R. (1996). Organophosphorus compounds preferentially affect second messenger systems coupled to M2/M4 receptors in rat frontal cortex. *Brain. Res. Bull*. Vol.39. 49-55.
- Yazal, J., Rao,S., Mehl, A., Slikker,W. (2001). Prediction of Organophosphorus Acetylcholinesterase Inhibition using Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship (3D-QSAR) Methods, *Toxicol. Sci*. Vol. 63, 223-232.