Artigo

Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico

Araújo, C. R. M.;* Santos, V. L. dos A.; Gonsalves A. A.

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (6), 1818-1834. Data de publicação na Web: 11 de novembro de 2016

<http://rvq.sbq.org.br>

Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme

Abstract: Acetylcholinesterase (AChE) has an unquestionable importance to functioning of cholinergic synapses present in our central and peripheral nervous system, which makes this enzyme an attractive target for the development of new drugs. In this context, knowledge of methods that can be employed to assess the enzymatic activity of AChE is an important factor to the success of scientific research related to this enzyme. Thus, this paper initially deals with the AChE and molecules capable of inhibiting or reactivate this biological catalyst. Then, are explained the basics of the different methodologies used to determine the enzymatic activity of AChE, from the simple and inexpensive, to methods that require larger investments in reagents and equipment. With this review, the authors provide some alternatives to the researchers to conduct the experiments involving the determination of AChE activity, so that they can evaluate and choose the most appropriate method for their trials.

Keywords: Acetylcholinesterase (AChE); Evaluation of Enzyme Activity of AChE; Inhibition and reactivation of AChE.

Resumo

A acetilcolinesterase (AChE) tem uma importância inquestionável para o adequado funcionamento das sinapses colinérgicas presentes em nosso sistema nervoso central e periférico, fato que torna esta enzima um alvo atraente para o desenvolvimento de novas drogas. Neste contexto, o conhecimento das metodologias que podem ser empregadas para avaliar a atividade enzimática da AChE é um fator importante para o sucesso de pesquisas científicas relacionadas a esta enzima. Desta forma, o presente trabalho inicialmente trata da AChE e de moléculas capazes de inibir ou reativar este catalisador biológico. Na segunda parte do artigo são explanados os fundamentos de diferentes metodologias utilizadas para se determinar a atividade enzimática da AChE, desde as mais simples e de baixo custo, até os métodos que necessitam de maiores investimentos em reagentes e equipamentos. Com esta revisão, os autores fornecem aos pesquisadores algumas alternativas para a realização de experimentos envolvendo a determinação da atividade da AChE, de forma que os mesmos possam avaliar e eleger o método mais adequado para seus respectivos ensaios.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase (AChE); Avaliação da Atividade Enzimática da AChE; Inibição e Reativação da AChE.

* Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Campus Petrolina Centro, CEP: 56304-917, Petrolina-PE, Brasil.

✉ cleonia.araujo@univasf.edu.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20160122](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122)

Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico

Cleônia Roberta M. Araújo,* Victória L. A. Santos, Arlan A. Gonsalves

Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Campus Petrolina Centro, CEP: 56304-917, Petrolina-PE, Brasil.

* cleonia.araujo@univasf.edu.br

Recebido em 7 de outubro de 2015. Aceito para publicação em 10 de novembro de 2016

1. Introdução
2. A Enzima Acetilcolinesterase (AChE)
 - 2.1. Inibidores da AChE
 - 2.2. Reativadores da AChE
3. Métodos de Avaliação da Atividade Enzimática da AChE
4. Considerações Finais

1. Introdução

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Nestas sinapses a ACh atua transmitindo a mensagem de um neurônio a outro. As sinapses colinérgicas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), sendo importante para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas.¹

Existem vários fármacos que apresentam como alvo as sinapses colinérgicas, podendo agir na enzima AChE, inibindo-a ou reativando-a. Como também, atuar em receptores de ACh como agonistas ou antagonistas. O betanecol é um fármaco colinérgico empregado no tratamento de alguns casos de retenção urinária, já o ipratrópio e a escopolamina são fármacos

anticolinérgicos empregados, respectivamente, como broncodilatador e antiespasmódico.²

Os fármacos que apresentam como mecanismo de ação a inibição da AChE são chamados de anticolinesterásicos ou colinérgicos indiretos. A AChE quando bloqueada é incapaz de hidrolisar a ACh, assim, este neurotransmissor tende a permanecer ativo por um período maior na fenda sináptica, fato que incrementa a transmissão colinérgica. Os fármacos que bloqueiam a AChE no SNP, como por exemplo a neostigmina, são utilizados na constipação atônica, atonia intestinal, na retenção urinária, na *miastnia gravis* e como antagonista dos miorelaxantes.³ Caso o inibidor da AChE (IAChE) apresente ação no SNC, como a Rivastigmina, este tem utilidade no tratamento da demência associada às doenças de Alzheimer e Parkinson.^{4,5}

Os carbamatos e organofosforados são

classes de pesticidas capazes de inibir a AChE. Apesar da elevada toxicidade destas substâncias, as mesmas ainda são largamente empregadas na agricultura e no uso doméstico. Nos casos de intoxicação por compostos destas classes, alguns dos tratamentos envolve o uso de reativadores da AChE, como a pralidoxima.⁶

Diante da importância da AChE como alvo para moléculas bioativas, a avaliação do potencial que compostos apresentem em inibir ou reativar a AChE tem grande relevância para o desenvolvimento de novos fármacos ou pesticidas. Assim, o presente artigo expõe algumas metodologias empregadas atualmente para avaliar, *in vitro*, a capacidade inibitória e de reativação da AChE inibida de compostos naturais ou sintéticos.

2. A Enzima Acetilcolinesterase (AChE)

Anatomicamente, o sistema colinérgico corresponde a uma parte da porção autônoma do sistema nervoso periférico (SNP). Ele é caracterizado pela presença de sinapses que têm como neurotransmissor a ACh. As sinapses colinérgicas não são encontradas apenas nessa parcela do SN, mas também, no SNC, na parte somática do SNP e nas junções ganglionares do sistema adrenérgico.¹

Nas sinapses colinérgicas estão presentes as colinesterases, que consistem em um classe de enzimas que catalisam a hidrólise da ACh em ácido acético e colina na fenda sináptica, e assim, permitem que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após ser ativado. Existem dois tipos de colinesterases: a Butirilcolinesterase (BuChE,

E.C.3.1.1.8) e a Acetilcolinesterase (AChE, E.C.3.1.1.7).⁷

Embora sejam evolutivamente semelhantes, estas enzimas diferenciam-se quanto a sua distribuição nos tecidos, as suas propriedades cinéticas e pela especificidade para com os seus substratos. A AChE encontra-se mais abundantemente no sistema nervoso central, nos músculo esqueléticos e na membrana dos eritrócitos. Enquanto que a BuChE encontra-se, em sua maioria, no plasma sanguíneo sendo por este motivo conhecida também como colinesterase plasmática.⁸

A AChE e BuChE apresentam semelhanças estruturais, sendo que seus aminoácidos apresentam aproximadamente 50% de homologia. Os outros 50% de heterogenia entre os aminoácidos são responsáveis pelas diferenças de seletividade tanto dos substratos quanto dos inibidores destas enzimas. A AChE hidrolisa preferencialmente a ACh enquanto que a BuChE é menos seletiva e atua hidrolisando tanto a ACh quanto a Butirilcolina (BuCh) em quantidades comparáveis.⁹

Na fenda sináptica a AChE é responsável por degradar a ACh, uma molécula simples que possui um grupo éster e uma amina quaternária. No neurônio pré-sináptico, a ACh é sintetizada a partir da colina e acetilcoenzima A (Acetil-CoA), sob catálise da colina acetiltransferase. Após sua formação, ela é armazenada em vesículas, onde fica depositada até que haja um estímulo que resulte em sua liberação na fenda sináptica. A partir desse ponto, a ACh se liga no receptor pós-sináptico propagando a informação. Após transmitir a mensagem, a molécula de ACh se desliga do receptor pós-sináptico e volta à fenda sináptica, onde ela sofre hidrólise catalisada pela AChE, dando origem a ácido acético e a colina¹⁰ (Figura 1).

Figura 1. Síntese e hidrólise da ACh

A AChE é uma enzima que apresenta três ramificações, ligadas por pontes dissulfeto, sendo fixada à membrana celular por colágeno. Cada ramificação é uma unidade

enzimática composta por quatro subunidades proteicas, capazes de hidrolisar a ACh. Resultando desta forma, num total de 12 sítios ativos por enzima¹¹ (Figura 2).

Figura 2. Desenho esquemático da AChE. Adaptado de Patrick, G. L. (2009)¹¹

As subunidades catalíticas da AChE possuem aminoácidos que são fundamentais para sua atividade. Os resíduos de histidina e serina são importantes para a hidrólise da ACh. Existem também dois pontos essenciais para a interação do neurotransmissor com a enzima. O primeiro é o sítio iônico, onde há uma interação entre a carga positiva do nitrogênio da ACh e a carga negativa produzida pelo resíduo de aspartato da AChE. O segundo é o sítio esteárico, onde o grupo éster da ACh faz ligação de hidrogênio com o resíduo de tirosina da AChE.¹²⁻¹⁴

A hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE depende dos resíduos de histidina, que funciona como um catalisador ácido-base, e de serina, que age como um nucleófilo. Na verdade, a serina por si só é incapaz de hidrolisar um éster, levando a histidina a exercer um papel importante na catálise.

Assim, as seguintes etapas são observadas:

- I. Após a chegada da ACh ao sítio ativo da AChE, a carbonila do neurotransmissor é atacada pelo par de elétrons da hidroxila do resíduo de serina. E a histidina atua como uma base retirando um próton do íon hidroxônio formado;
- II. A histidina protonada atua posteriormente como um ácido, doando um próton para a porção colina da ACh, que é então liberada;

A saída da porção colina deixa a AChE acetilada e, para que a enzima volte a ter atividade esta sofrerá hidrólise, com a água atuando como nucleófilo. Então, ácido acético é formado neste processo e o resíduo de serina é liberado, fazendo com que a enzima esteja pronta para atuar novamente¹⁰ (Figura 3).

Figura 3. Esquema da hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE. Adaptado de Fifer, E. K. (2007)¹⁰

2.1. Inibidores da AChE

Os fármacos inibidores da AChE (IACHe) são denominados anticolinesterásicos, e estes são terapeuticamente utilizados nos seguintes casos: para reverter o bloqueio neuromuscular promovido por miorrelaxantes adespolarizantes, no tratamento da *miastenia gravis*, atonia do músculo liso, no estrabismo¹⁵ e no tratamento dos sintomas da Doença de Alzheimer.^{4,5} Um anticolinesterásico retarda a degradação da ACh, assim o neurotransmissor passa mais tempo na fenda sináptica, intensificando desta forma a transmissão colinérgica, conforme Figura 4.

A fisostigmina, um alcaloide obtido do

Physostigma venenosum L., foi o primeiro IACHe descoberto. Seus efeitos colinérgicos são conhecidos há muitos anos e, em 1923, a estrutura molecular da substância ativa foi elucidada. Em 1929 Stedman desvendou que os efeitos colinomiméticos da fisostigmina deviam-se à inibição reversível da AChE.¹⁰ Atualmente, este fármaco é aplicado no tratamento do glaucoma e em casos de overdose por compostos anticolinérgicos, como a atropina, e antidepressivos tricíclicos, como a amitriptilina.¹⁵

A neostigmina e a piridostigmina são análogos simplificados da fisostigmina. Ambos são fármacos empregados no tratamento de *miastenia gravis* e reverterem os efeitos de bloqueadores neuromusculares, como os da tubocurarina (Figura 5).¹⁵

Figura 4. Sinapse colinérgica na ausência e a na presença de um IACHÉ

Figura 5. Estrutura molecular da fisostigmina, neostigmina e piridostigmina

Os anticolinesterásicos fisostigmina, neostigmina e piridostigmina apresentam em suas estruturas moleculares a função orgânica carbamato, sendo esta responsável pela inibição da AChE que ocorre nas seguintes etapas:

I. No sítio catalítico da AChE, a carbonila do carbamato é atacada pela hidroxila do resíduo de serina, neste momento, a histidina atua como uma base recebendo um próton;

II. Em seguida, a histidina funcionará como um ácido doando um próton para a

liberação de uma porção do carbamato. Nesta etapa, a enzima fica impedida de realizar hidrólise, visto que seu sítio catalítico encontra-se ocupado;

Na última etapa, o resíduo de serina ocupado com o grupo carbamato sofre hidrólise lentamente e a enzima torna-se ativa novamente. A velocidade de recuperação da enzima ocupada com um grupo carbamato é mais lenta que quando esta se encontra ocupada com um grupo acetato (Figura 6).¹¹

Figura 6. Mecanismo de inibição da AChE por carbamatos. Adaptado de Patrick, G. L. (2009)¹¹

O emprego de colinomiméticos no tratamento da Doença de Alzheimer (DA) é atribuído à capacidade que esta classe de fármacos possui de potencializar a função colinérgica, induzindo melhora no perfil cognitivo e também de alguns efeitos comportamentais oriundos da doença.¹⁶ Várias alternativas terapêuticas foram avaliadas no intuito de se corrigir o déficit colinérgico em portadores de DA. Algumas estratégias empregam moléculas precursoras da ACh, como a colina ou a lecitina. Outras se baseiam na utilização de agentes promotores da liberação de ACh, como o 4-aminopiridina. Há também aquelas que proporcionam uma maior recaptação de ACh na fenda sináptica, antes mesmo desta ser degradada pela AChE. Por fim, existem vertentes que acreditam no uso de agonistas colinérgicos diretos. Dentre todas as abordagens terapêuticas descritas para a DA, a que vem obtendo melhores resultados é a utilização de IACHE.¹⁷

O primeiro medicamento sintético IACHE aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da DA foi a tacrina. Esse fármaco possui os seguintes inconvenientes: é altamente hepatotóxico e estimula o sistema colinérgico periférico, levando a desconfortos gastrointestinais como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia.¹⁸ Devido a uma eficácia relativamente pequena e efeitos colaterais significativos, a utilidade clínica deste IACHE é bastante limitada. Atualmente, além da tacrina, outros três fármacos são comercialmente disponíveis para o

tratamento da DA: o donepezil e a rivastigmina.¹⁸

2.2. Reativadores da AChE

Pesticidas dos tipos organofosforados e carbamatos são capazes de inibir a AChE, sendo esta a causa da alta toxicidade destes compostos. Estima-se que em países em desenvolvimento, os agrotóxicos causem anualmente 70 mil intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito.²⁰ No Brasil, o Ministério da Saúde estima que, por ano, existam mais de 400 mil pessoas contaminadas por agrotóxicos, com cerca de 4 mil mortes. Dentro deste cenário, os organofosforados são responsáveis pelo maior número de intoxicações agudas e mortes.¹⁹

O tratamento de intoxicação por um IACHE pode ser realizado com a administração de um antimuscarínico, tal como a atropina ou, com o uso de compostos capazes de reativar a AChE inibida, tal como a pralidoxima, um fármaco da classe das oximas comercialmente disponível no Brasil. As oximas são grupos funcionais orgânicos com fórmula geral $(R')(R'')C=N-OH$.²⁰ Fármacos que apresentam em sua estrutura este grupo, tal como a pralidoxima, são capazes de atacar o átomo de fósforo do resíduo de serina fosforilado, resultando na remoção do grupo fosforil e na reativação da enzima inibida (Figura 7).²¹

Figura 7. Esquema de inibição da AChE por organofosforados e reativação pela pralidoxima. Adaptado de Patrick, G. L. (2009)¹¹

Apesar da existência destes dois tipos de tratamento para intoxicação por IACHe, cabe relatar algumas limitações dos mesmos, por exemplo: os fármacos antimuscarínicos não antagonizam os efeitos dos organofosforados nos receptores nicotínicos e, as oximas por sua vez, não atravessam facilmente a barreira hemato-encefálica para reativarem enzimas inibidas por tais agentes a nível de SNC.²²

3. Métodos de Avaliação da Atividade Enzimática da AChE

Os primeiros estudos que visavam avaliar a atividade biológica da enzima AChE utilizavam tecidos animais específicos que continham a enzima. A partir da década de 1930 os pesquisadores passaram a trabalhar com a enzima isolada. Nachmansohn e Lederer purificaram a colinesterase do tecido elétrico de enguia-elétrica (*Electrophorus electricus*) e chegaram a obter 1 mg de proteína capaz de hidrolisar 3000 mg de ACh por hora.²³ Em 1954, Zittle e Colaboradores isolaram a AChE de eritrócitos humanos.²⁴

Inicialmente os métodos utilizados para avaliar a atividade da AChE relatados na literatura foram o manométrico e o de titulação ácido-base. Estes testes quantificam

o ácido acético produzido durante a hidrólise da ACh. No primeiro caso, a hidrólise ocorre em tampão $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ levando à formação de ácido acético que, por sua vez, reage com a base do tampão e promove a liberação de CO_2 , sendo este último medido por intermédio do aparelho manométrico de Warburg.²⁵ Além deste, outros aparelhos manométricos também podem ser usados para estimar a quantidade de CO_2 produzida, como ocorre no método diferencial de Barcroft e no método de Van Slyke.²⁶ O ácido acético produzido a partir da hidrólise da ACh também pode ser titulado com solução alcalina de concentração conhecida, onde vários indicadores ácido/base podem ser usados, como por exemplo, a fenoftaleína, o vermelho de fenol e o azul de bromotimol.²⁵ Um método mais conveniente para indicar a mudança de pH é a titulação potenciométrica utilizando eletrodo de quinina/hidroquinona, eletrodo de vidro ou eletrodo de antimônio.²⁶⁻²⁸

Em 1947, Huggins e Lapidés utilizaram o propionato de *p*-nitrofenol para mensurar a atividade enzimática da AChE por via colorimétrica, visto que o éster é incolor e após ser hidrolisado pela enzima produz um composto amarelo, o *p*-nitrofenol, que é quantificado por colorimetria, sendo as leituras executadas com auxílio de um galvanômetro (Figura 8).²⁹

Figura 8. Formação do produto colorido *p*-nitrofenol a partir da hidrólise do propionato de *p*-nitrofenol pela AChE

Partindo do mesmo princípio, Kramer e Gamson empregaram o acetato de indofenol como agente colorimétrico para a determinação da atividade da AChE. Neste método, a determinação enzimática está relacionada com a geração do cromóforo de

indofenol (azul), resultado da reação de hidrólise do acetato de indofenol (vermelho) pela AChE (Figura 9). O cromóforo azul gerado é então monitorado espectrofotometricamente em 625nm.^{25,30}

Figura 9. Formação do indofenol, resultado da hidrólise do acetato de indofenol pela AChE

O método desenvolvido por Kramer e Gamson foi utilizado em 1959 por Archer e Zweig, para estimar a atividade inibitória de inseticidas organofosforados sobre a AChE. Neste experimento, um branco positivo, solução com acetato de indofenol e AChE, é utilizado como referência para avaliar a percentagem de inibição da enzima pelos compostos em análise.³¹

Considerando que a espectrofluorimetria é uma técnica instrumental mais sensível que a espectrofotometria,³² Guilbault e Kramer propuseram quatro substâncias fluorogênicas para serem utilizadas na determinação da atividade catalítica da AChE: o butirato de

resorufina, o acetato de indoxil e os acetatos e butiratos de α e β -naftol. Este método é baseado na hidrólise de um éster que inicialmente não exibe fluorescência, mas que, ao sofrer hidrólise pela AChE, dá origem a um produto fluorescente.

O butirato de resorufina não é fluorescente mas, ao sofrer hidrólise enzimática, o ânion formado é bastante fluorescente, absorvendo em $\lambda_{\text{max}} = 540\text{-}570\text{nm}$ e emitindo em 580nm. Então, a atividade enzimática da AChE será avaliada pela quantidade de produto fluorescente formado (Figura 10).^{33,34}

Figura 10. Formação do produto fluorescente a partir do butirato de resorufina

Outro éster não fluorescente utilizado para avaliar a atividade enzimática da AChE é o acetato de indoxil. Ao sofrer hidrólise pela enzima, este reagente leva à formação do produto fluorescente, o indoxil. Esta reação é sucedida de dimerização em presença de oxigênio e produz o índigo branco, também

fluorescente ($\lambda_{ab} = 395\text{nm}$ e $\lambda_{em} = 470\text{nm}$). Em pH menor que 7, o índigo branco formado é estável por algum tempo, não sendo oxidado ao índigo blue. Em pH alcalino, a fluorescência da solução desaparece rapidamente, já que o índigo branco oxida ao índigo blue (Figura 11).^{25,34}

Figura 11. Hidrólise enzimática do acetato de indoxil e formação do indoxil, índigo branco e índigo blue

Os acetatos e butiratos de α e β -naftol não são fluorescentes, mas quando hidrolisados pela AChE geram compostos fluorescentes, o α -naftol ($\lambda_{ab} = 330\text{nm}$; $\lambda_{em} = 460-470\text{nm}$) e o β -naftol ($\lambda_{ab} = 320\text{nm}$; $\lambda_{em} =$

410nm). Baseado neste princípio, um método para estimar a atividade enzimática da AChE foi desenvolvido, onde a fluorescência emitida pelo α e β naftol é utilizada para calcular a atividade da AChE (Figura 12).²⁵

Figura 12. Formação dos produtos fluorescentes α -naftol e β -naftol a partir de ésteres não fluorescentes

Fundamentado no método descrito anteriormente, Guilbault e Kramer, produziram um sistema para identificar compostos anticolinesterásicos. Nesta metodologia, a AChE é imobilizada em uma matriz de amido e aplicada em uma espuma de poliuretano, que é então colocada em um tubo de vidro. Neste caso, o substrato enzimático utilizado é o acetato de β -naftol, e

a atividade inibitória da AChE é mensurada pela ausência de fluorescência.³⁵

Ravin, Tsou e Seligman desenvolveram um método para determinar a atividade catalítica da AChE de forma indireta e usando como substrato o iodeto de β -carbonaftoxicolina ou o seu análogo 6-bromo. Neste ensaio, a AChE hidrolisa a β -carbonaftoxicolina a ácido β -naftilcarbônico, este por sua vez, descarboxila para β -naftol. Após a formação

do β -naftol é adicionado ao ensaio o sal de diazônio (sal duplo de zinco do *O*-Dianisidina bis-diazotada ou sal azul de diazônio) que reage produzindo um diazocomposto altamente colorido e insolúvel. O precipitado

é então extraído em solvente orgânico e posteriormente quantificado por espectrofotometria em 540nm para estimar de forma indireta a atividade da AChE (Figura13).³⁶

Figura 13. Formação do β -naftol a partir do iodeto de β -carbonatocolina, seguida da formação do diazocomposto

Em 2001, Marston adaptou o método anteriormente descrito, empregando placa de sílica gel para cromatografia em camada delgada, para identificar de forma qualitativa compostos inibidores da AChE.³⁷

Hestrin propôs um método colorimétrico para estimar a atividade enzimática da AChE baseando-se na quantidade de ACh não

hidrolisada. Neste caso, o substrato que não reagiu é submetido a um tratamento com hidroxilamina para gerar a *N*-hidroxiacetamida. Por fim, esta é quantificada, em 540 nm, após formação do complexo púrpura com íons ferro (III) (Figura 14).³⁸

Figura 14. Formação do *N*-hidroxiacetaminda resultado da reação da ACh com a hidroxilamina

Em 1961, Ellman e Colaboradores propuseram o método colorimétrico mais empregado atualmente para a determinação da atividade da AChE. Este procedimento foi desenvolvido pela combinação dos conhecimentos divulgados por Koelle (1951) e Ellman (1951), onde neste último é exposto o emprego do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), reagente de Ellman, na quantificação de compostos de enxofre

em tecidos celulares.³⁹ O método de Ellman é baseado na taxa de hidrólise da acetiltiocolina (ACTI) pela AChE dando origem à tiocolina, que reage com o ânion carboxilato do DTNB, formando o 2-nitrobenzoato 5-mercaptotiocolina e um ânion de coloração amarela, o 5-tio-2-nitrobenzoato, que é quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 412 nm (Figura 15).⁴⁰

Figura 15. Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato

A atividade enzimática é calculada a partir da inclinação (coeficiente angular) da região linear da curva de cinética obtida por espectrofotometria de absorção molecular, a

qual corresponde numericamente à variação de absorbância no decorrer do tempo ($\Delta A/\Delta t$) (Equação 1).⁴¹

$$Z/m = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V \times 1000}{\epsilon \times d \times v \times \rho} \quad \text{Eq. 1}$$

Na Equação 1, a atividade catalítica enzimática Z/m é dada em Ug⁻¹; ΔA , a

variação de absorbância; V, o volume do ensaio (L); ϵ , o coeficiente de absorção do

ânion 5-tio-2-nitrobenzoato ($1,36 \text{ mmol}^{-1}\text{mm}^{-1}$); d , o caminho óptico da cubeta (mm); Δt , a variação do tempo do ensaio cinético (min); v , o volume da amostra utilizada no ensaio (L) e p , a concentração da enzima utilizada no ensaio (gL^{-1}).

Nesta metodologia, a leitura das absorbâncias é realizada em um espectrofotômetro que utiliza cubetas com volumes entre 1,5 mL e 3,5 mL. Desta forma, grandes volumes de soluções são necessários para realizar o experimento. Em 2001, Rhee e Colaboradores adaptaram o ensaio para microplacas, que possuem 96 poços de 0,5 mL. Assim, um número maior de amostras pode ser avaliado de uma só vez, e um volume reduzido de solução é necessário para realizar o ensaio.⁴²

O princípio do ensaio de Ellman foi empregado em 1991 por Kiely e Colaboradores para realizar de forma rápida

um teste qualitativo de prováveis substâncias inibidoras da AChE. Neste ensaio, placas de cromatografia em camada delgada (CCD) serviram de suporte para as substâncias testadas e soluções de DTNB, acetiltiocolina e AChE são borrifadas. Quando a substância apresenta atividade inibitória da AChE, forma-se um halo branco ao redor do local em que a substância foi aplicada após aproximadamente 5 minutos da aplicação do último reagente, enquanto que o resto da placa torna-se amarela.^{42,43}

Em 2000, Ingkaninam e Colaboradores realizaram uma modificação mais sofisticada do ensaio de Ellman, onde uma técnica de separação foi acoplada ao experimento. Neste trabalho, um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi conectado a um sistema de fluxo com 4 bombas, três confluências e um detector espectrofotométrico (Figura 16).⁴⁴

Figura 16. Desenho esquemático do aparelho de CLAE acoplado ao sistema de fluxo como uma adaptação ao ensaio de Ellman. Adaptado de Ingkaninan K. et al., (2000)⁴⁴

A amostra complexa é colocada no aparelho de CLAE e, após a separação, esta segue para a confluência 1. A confluência 1 guia parte da amostra que foi separada para um detector e a outra para a confluência 2, onde combina-se com as soluções de DTNB e AChE. A mistura formada na confluência 2 é então propulsionada em direção à confluência 3, onde mistura-se com a solução

de ACTI e é encaminhada para o detector espectrofotométrico. Neste sistema, uma amostra complexa é separada via CLAE e, posteriormente, o potencial anticolinesterásico das frações obtidas é determinado. Assim, usando um sistema relativamente simples, uma amostra complexa pode ser analisada de forma rápida e direta.

O ensaio de Ellman e suas modificações atualmente são extensivamente utilizados para determinar a atividade inibidora da AChE de compostos tanto de origem natural quanto sintética. O grande número de adeptos a esta metodologia está relacionado à praticidade, sensibilidade e reprodutibilidade do método.

A determinação da atividade da AChE em amostras de sangue é uma ferramenta adequada para indicar a exposição ou intoxicação por organofosforados.⁴² Muito embora seja bastante rápido, simples e barato, o método de Ellman não permite a determinação exata da AChE em sangue total ou em eritrócitos devido à interferência com a absorção da hemoglobina, uma vez que o máximo de absorção do íon 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato em 412 nm coincide com a banda Soret da hemoglobina. Amostras de sangue altamente diluídas podem ser utilizadas, contudo, a sensibilidade do ensaio será reduzida. Além disso, o DTNB reage lentamente com grupos sulfidríla da matriz de hemácias, o que pode interferir nos resultados.

Na década de 1950 o interesse dos pesquisadores em avaliar a capacidade de determinadas substâncias em reativar a AChE inibida já existia, e o método utilizado na época para avaliar a atividade da enzima era principalmente o monométrico.⁴³⁻⁴⁴ Inclusive, o potencial da pralidoxima (iodeto de metil piridina-2-aldoxima) em reativar a AChE foi descoberto neste período.⁴⁸⁻⁵⁰ E, na década de 80, surgiram os primeiros trabalhos empregando adaptações do método da Ellman para avaliar a capacidade de moléculas em reativar a AChE após inibição por organofosforados, apesar do método de Ellman ter sido desenvolvido em 1961 e o interesse por moléculas reativadoras da AChE datar à década de 50.

Jong e Wolring, em 1984, publicaram um artigo onde foi mostrado a capacidade de dez oximas em reativar a enzima AChE eritrocitária de ratos, bovina, humana e de peixe elétrico inibidas pelo organofosforado soman. E o método empregado para avaliar a

atividade enzimática foi o desenvolvido por Ellman.⁵¹ Neste caso, a hemoglobina não interferiu nos ensaios, visto que a enzima empregada encontrava-se nos eritrócitos fantasmas livre de hemoglobina (Hemoglobin-free erythrocyte ghosts). A partir deste trabalho, muitos outros autores também empregaram o método de Ellman para a mesma finalidade. Este foi o caso de Worek e Colaboradores que avaliaram a cinética de reativação da pralidoxima, albidoxima, HI-6 oxima e HLö 7 de AChE eritrocitárias de ratos, cobaias, coelhos e humanos inibidas por sarin, ciclosarin e VX (O-etil-S-[2-(diisopropilamino)-etil]-metilfosfonotioato).⁵²

Atualmente, tais adaptações ao método descrito por Ellman³⁹ estão sendo empregadas na prática clínica para o diagnóstico de intoxicações causadas por organofosforados, sob a forma de kits espectrofotométricos, uma vez que este consiste em um teste simples, prático, acessível e de alta reprodutibilidade e que permite quantificar a atividade da AChE eritrocitária.⁵³

4. Considerações Finais

Moléculas capazes de inibir ou reativar a enzima AChE são potenciais fármacos para Doença de Alzheimer e como antídotos para intoxicação por organofosforados. O sucesso em desenvolver fármacos destas classes depende da eficiência e praticidade dos ensaios empregados para avaliar a atividade da AChE. Algumas variáveis são consideradas durante a escolha de uma metodologia por um pesquisador, diante disso, o presente trabalho mostra os métodos já empregados para avaliar a atividade enzimática da AChE, e assim auxiliar o pesquisador em sua escolha considerando a sua realidade.

Referências Bibliográficas

- ¹ Westfall, T. C.; Westfall, D. P. Em *Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica*, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 6.
- ² Brown, J. H.; Taylor, P. Em *Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica*, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 7.
- ³ Taylor, P. Em *Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica*, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 8.
- ⁴ Inouye, K.; Oliveira, G. H. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para Doença de Alzheimer. *Infarma* **2004**, *15*, 80. [\[Link\]](#)
- ⁵ Standaert, D. G.; Young, A. B. Em *Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica*, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 20.
- ⁶ Worek, F.; Koller, M.; Thiermann, H.; Szinicz, L. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology* **2005**, *214*, 182. [\[CrossRef\]](#)
- ⁷ Colovic, M. B.; Krstic, D. Z.; Lazarevic-Pasti, T. D.; Bondzic, A. M.; Vasic, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* **2013**, *11*, 315. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁸ Muller, T. C.; Rocha, J. B. T.; Morsch, V. M.; Neis, R. T.; Schetinger, M. R. C. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, *1*, 92. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁹ Pezzementi, L.; Nachon, F.; Chatonnet, A. Evolution of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Vertebrates: An Atypical Butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes*. *PlosOne* **2011**, *6*, 17396. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁰ Fifer, E. K. Em *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 6a. Ed.; Lemke, T. L.; Williams, D. A., eds.; Lippincott Williams & Wilkins, 2007, cap. 12.
- ¹¹ Patrick, G. L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4a. ed.; Oxford University Press, 2009, cap. 22.
- ¹² Bergmann, F.; Wilson, I. B.; Nachmansohn, D. Acetylcholinesterase IX. Structural features determining the inhibition by amino acids and related compounds. *The Journal of Biological Chemistry* **1950**, *186*, 693. [\[Link\]](#)
- ¹³ Wilson, I. B.; Bergmann, F. Acetylcholinesterase VIII. Dissociation constants of the active groups. *The Journal of Biological Chemistry* **1950**, *186*, 683. [\[Link\]](#)
- ¹⁴ Wilson, I. B.; Bergmann, F.; Nachmansohn, D. Acetylcholinesterase X. Mechanism of the catalysis of acylation reactions. *The Journal of Biological Chemistry* **1950**, *186*, 781. [\[Link\]](#)
- ¹⁵ Silva, P. Em *Farmacologia*, 6a. Ed.; Silva, P., Eds.; Guanabara, 2002, cap. 32.
- ¹⁶ Viegas, C. J.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Produtos Naturais como Candidatos a Fármacos Úteis no Tratamento do Mal De Alzheimer. *Química Nova* **2004**, *27*, 655. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁷ Mustazza, C.; Borioni, A.; Del Giudice, M. R.; Gatta, F.; Fenetti, R.; Meneguz, A.; Volpe, M. T.; Lorenzini, P. Synthesis and cholinesterase activity of phenylcarbamates related to Rivastigmine, a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *European Journal Medicinal Chemistry* **2002**, *37*, 91. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁸ Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal Neurology, Neurosurgery Psychiatry* **1999**, *66*, 137. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁹ Bedor, C. N. G.; Ramos, L. O.; Pereira, P. J.; Rêgo, M. A. V.; Pavão, A. C.; Augusto, L. G. S. Vulnerabilidades e situações de riscos relacionados ao uso de agrotóxicos na

- fruticultura irrigada. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **2009**, 12, 39. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁰ Dindar, M. H.; Fathi, S. A. M.; Yaftian, M. R.; Noushiranzadeh, N. Solid phase extraction of copper(II) ions using C18-silica disks modified by oxime ligands. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, 179, 289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²¹ Renou, J.; Mercey, G.; Verdelet, T.; Paunescu, E.; Gillon, E.; Arboleas M.; Liodice, M.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Nachon, F.; Jean, L.; Renard, P.-Y. Syntheses and in vitro evaluations of uncharged reactivators for human acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, 203, 81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²² Bierwisch, A.; Zengerle, M.; Thiermann, H.; Kubik, S.; Worek, F. Detoxification of alkyl methylphosphonofluoridates by an oxime-substituted β -cyclodextrin – An in vitro structure–activity study. *Toxicology Letters* **2014**, 224, 209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²³ Nachmansohn, D.; Rothenberg, M. A. Studies on cholinesterase I. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. *The Journal of Biological Chemistry* **1945**, 158, 653. [\[Link\]](#)
- ²⁴ Zittle, C. A.; DellaMonica, E. S.; Custer, J. H. Purification of Human Red Cell Acetylcholinesterase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1954**, 43. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁵ Guilbault G. G.; *Determination of Enzymes. Enzymatic Methods of Analysis*. New York, Pergamon Press, 1973, v. 1, p.43-106.
- ²⁶ Summer J. B., Myrback K.; *The Enzymes*, 1a ed., Academic Press, New York, 1951, cap.10, p. 443 - 472.
- ²⁷ Glick D. Studies on Enzymatic Histochemistry. *The Journal of General Physiology* **1938**, 21, 289. [\[PubMed\]](#)
- ²⁸ Barbour H. G.; Dickerson V. The Pharmacological Action of Deuterium Oxide. VII. Its Effect on the Hydrolysis of Acetylcholine. *Journal of Pharmacology Experiment and Therapeutics* **1938**, 65, 281. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁹ Huggins, C.; Lapides, J. Chromogenic Substrates IV. Acyl Esters of *p*-Nitrophenol as Substrates for the Colorimetric Determination of Esterase. *The Journal of Biological Chemistry* **1947**, 170, 467. [\[Link\]](#)
- ³⁰ Kramer, D. N.; Gamson, R. M. Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Analytical Chemistry* **1958**, 30, 251. [\[CrossRef\]](#)
- ³¹ Archer, T. E.; Zweig, G. Direct Colorimetric Analysis of Cholinesterase-Inhibiting Insecticides with Indophenol Acetate. *Agricultural and Chemistry* **1959**, 7, 178. [\[CrossRef\]](#)
- ³² Lowry, O. H. A micro photofluorometer. *Journal of Biology Chemistry* **1948**, 173, 677. [\[Link\]](#)
- ³³ Guilbault, G. G.; Kramer, D. N. Resorufin Acetate as Substrate for Determination of Hydrolytic Enzymes at Low Enzyme and Substrate Concentrations. *Analytical Chemistry* **1964**, 36, 1662. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁴ Guilbault, G. G.; Kramer, D. N. Resorufin Butyrate and Indoxyl Acetate as Fluorogenic Substrates for Cholinesterase. *Analytical Chemistry* **1965**, 37, 120. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁵ Guilbault, G. G.; Kramer, D. N. Fluorometric System Employing Immobilized Cholinesterase for Assaying Anticholinesterase Compounds. *Analytical Chemistry* **1965**, 37, 1675. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁶ Ravin, H. A.; Tsou, K.-C., Seligman, A. M. Colorimetric Estimation and Histochemical Demonstration of Serum Cholinesterase. *The Journal of Biological Chemistry* **1951**, 191, 843. [\[Link\]](#)
- ³⁷ Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochemical Analysis* **2001**, 13, 51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁸ Hestrin, S. The Reaction of Acetylcholine and Other Carboxylic Acid Derivatives with

- Hydroxylamine and its Analytical Application. *The Journal of Biological Chemistry* **1949**, *180*, 249. [\[Link\]](#)
- ³⁹ Ellman G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Archive Biochemical Biophysical* **1959**, *82*, 70. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁰ Ellman G.L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, *7*, 88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴¹ Razzino, C. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, 2007. [\[Link\]](#)
- ⁴² Rhee, K.; Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors from Amaryllidaceae Using Silica Gel Thin - Layer Chromatography in Combination with Bioactivity Staining. *Journal of Chromatography A* **2001**, *915*, 217. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴³ Kiely, J. S; Moos, W. H.; Pavia, M. R.; Schwarz, R. D.; Woodard, G. L. A Silica Gel Plate-Based Qualitative Assay for Acetylcholinesterase Activity: A Mass Method to Screen for Potential Inhibitors. *Analytical Biochemistry* **1991**, *196*, 439. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁴ Ingkaninan, K.; Best, C. M.; Heijden, R. ; Hofte, A. J. P.; Karabatak, B.; Irth, H.; Tjaden, U. R.; Greef, J. ; Verpoorte, R. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *Journal of Chromatography A* **2000**, *872*, 61. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁵ Worek, F.; Mast, U.; Kiderlen, D.; Diepold, C.; Eyer, P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta* **1999**, *1-2*, 73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁶ Irwin, B. W. Acetylcholinesterase: XIII. Reactivation of Alkyl Phosphate-Inhibited Enzyme. *The Journal Biology Chemistry* **1952**, *199*, 113. [\[Link\]](#)
- ⁴⁷ Irwin, B. W.; Estelle, K. M. Reactivation of Acetylcholinesterase Inhibited by Alkylphosphates. *Journal American Chemical Society*, **1953**, *75*, 4628. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁸ Irwin, B. W.; Ginsburg, S. A powerful reactivator of alkyl phosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1955**, *18*, 168. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁹ Hobbiger, F.; Pitman, M.; Sadler, P. W. Reactivation of phosphorylated acetylcholinesterases by pyridinium aldoximes and related compounds. *Biochemistry Journal* **1960**, *75*, 363. [\[Link\]](#)
- ⁵⁰ Gilbert, G.; Wagner-Jauregg, T.; Steinberg, G. M. Hydroxamic Acids: Relationship between Structure and Ability to Reactivate Phosphonate-Inhibited Acetylcholinesterase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1961**, *93*, 469. [\[CrossRef\]](#)
- ⁵¹ Jong, L. P. A.; Wolring, G. Z. Stereospecific Reactivation by Some Hagedorn-oximes of Acetylcholinesterases from Various Species Including Man, Inhibited by Soman. *Biochemical Pharmacology*, **1984**, *33*, 1119. [\[CrossRef\]](#)
- ⁵² Worek, F.; Reiter, G.; Eyer, P.; Szinicz L. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Archives Toxicology* **2002**, *76*, 523. [\[CrossRef\]](#)
- ⁵³ Miao, Y.; He, N.; Zhu, J.-J. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 5219. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)