



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Campus do Litoral Paulista



IGOR NICODEMO DE OLIVEIRA

**PAF-AH PLASMÁTICA DE *DANIO RERIO* E SUA RELAÇÃO COM A
PAF-AH humana: construção de modelo estrutural para
investigação de interações com nitrozaminas e malathion em
enzimas homólogas**

SÃO VICENTE
10/2023

IGOR NICODEMO DE OLIVEIRA

PAF-AH PLASMÁTICA DE *DANIO RERIO* E SUA RELAÇÃO COM A PAF-AH humana: construção de modelo estrutural para investigação de interações com nitrozaminas e malathion em enzimas homólogas

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da UNESP – Campus do Litoral Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título bacharel em Ciências Biológicas, com habilitação em Biologia Marinha.

Orientador(a): Marcos Hikari Toyama

Coorientador(a): Marcos Antonio de Oliveira

Nicodemo, Igor

N633p

PAF-AH plasmática de *Danio rerio* e sua relação com a PAF-AH humana: : construção de modelo estrutural para investigação de interações com nitrozaminas e malathion em enzimas homólogas / Igor Nicodemo. -- São Vicente, 2023

53 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Marcos Hikari

Coorientador: Marcos Antonio de Oliveira

1. PAF-AH. 2. zebrafish. 3. modelagem molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

À minha família e docentes que participaram da minha formação como homem, por me fazerem descobrir o amor ao conhecimento e pela motivação e apoio incondicionais.

Ao meu tio Francisco Carlos Stéfano pela luta por meus direitos enquanto estudante.

À minha avó paterna, Marlyse Bonagura de Oliveira, que desde cedo cuidou para que eu pudesse ser um cidadão consciente de meu papel na natureza.

Pelas fitas vídeocassete de “Natureza sabe tudo”,

pelo carinho nas horas de angústia

pelas melhores refeições de minha vida

pelos abraços sinceros e as rezas...

Expresso imensa gratidão a todos vocês por terem me abençoado!

DEDICO.

Agradecimentos

Agradeço às instituições fomentadoras (CNPq e UNESP) que permitiram a exequibilidade do trabalho. Os funcionários, orientadores e amigos que me ensinaram as técnicas e garantiram a boa convivência no ambiente acadêmico.

Em especial agradeço ao auxílio fundamental prestado por Airam Roggero e Caroline Ramos da Cruz Costa, que tornaram o projeto possível. Obrigado pela amizade e profissionalismo.

RESUMO

Nitrosaminas e malathion são agentes químicos com potencial pró-oxidativo, capaz de modificar a membrana plasmática de células. A peroxidação dos fosfolipídeos de membrana relaciona-se com a ativação de enzimas de remodelação, como a fosfolipase A2 citosólica (cPLA2), envolvida na produção do fator de agregação plaquetária (PAF). O PAF é um mediador lipídico inflamatório e também o substrato principal da PAF acetilhidrolase (PAF-AH), responsável pela sua neutralização. A PAF-AH, portanto, é uma enzima regulatória, que pode ser encontrada no plasma sanguíneo dos vertebrados sob a forma de um complexo com lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL), enquanto sinônimo de fosfolipase A2 associada a lipoproteínas (PLA2-Lp, da família VII). Nas últimas duas décadas a PLA2-Lp foi alvo de grande interesse científico, que revelou lacunas sobre seu papel protetor nos organismos frente ao estresse oxidativo induzido. A que se convém, a PAF-AH possui tendência a preservar sua morfologia e função nos vertebrados, o que permite deduções experimentais a partir de análises de modelos de peixes. Nesta direção, o presente trabalho consiste em criar um modelo *in silico* robusto da PLA2-Lp de *Danio rerio* para efetuar simulações de ancoragem molecular capazes de prever o comportamento desta enzima frente ao malathion e nitrosaminas. Por fim, nossos modelos *in silico* são confrontados com ensaios enzimáticos *in vitro* de atividade enzimática para PAF-AH secretória de *Mus musculus* em diferentes tratamentos, demonstrando a capacidade de ambos em inibir a ação da PAF-AH em determinadas circunstâncias.

Palavras chaves: PAF acetilhidrolase, zebrafish, modelagem molecular.

Instituição-sede: UNESP, Institute of Biosciences - Câmpus do Litoral Paulista - São Vicente - Praça Infante Dom Henrique s/nº - CEP 11.330-900 - Parque Bitaru - São Vicente

ABSTRACT

Nitrosamines and malathion are two chemical agents with pro-oxidative potential, that can lead to structural changes in cell membrane. The peroxidation of phospholipids of the cell membrane activates remodeling enzymes, including cytosolic phospholipase A2 (cPLA2), involved in the production of the platelet aggregation factor (PAF). PAF is an inflammatory lipid mediator and also the main substrate of PAF acetylhydrolase (PAF-AH), responsible for its neutralization. PAF-AH, therefore, is a regulatory enzyme, that can be found in vertebrate blood in complex with low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL), known as the synonym of lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA2, VII family). In the last two decades Lp-PLA2 has been a target for major scientific interest, which revealed the lack of knowledge regarding its protector role in living beings in response to induced oxidative stress. Conveniently PAF-AH tends to preserve its morphology and function in vertebrates, which allows experimental deductions from fish model analysis. In this direction, the present project consists in the creation of a robust *in silico* model of Lp-PLA2 of *Danio rerio* to carry out molecular docking capable of predicting this enzyme behavior in the presence of malathion and nitrosamine. Finally, our *in silico* models are confronted with enzymatic *in vitro* assays that monitor the secretory PAF-AH of *Mus musculus* activity in different treatments, demonstrating that malathion and nitrosamines possibly inhibit PAF-AH in some circumstances.

Keywords: PAF-acetylhydrolase, zebrafish, molecular modeling.

Host Institution: UNESP, Institute of Biosciences - Câmpus do Litoral Paulista - São Vicente - Praça Infante Dom Henrique s/nº - CEP 11.330-900 - Parque Bitaru - São Vicente

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS.

Figura 1. Reação de catálise do PAF.....	14
Figura 2. Sequência completa da PAF-AH humana.....	15
Figura 3. Orientação da PAF-AH de <i>Homo sapiens</i> em membrana.....	16
Figura 4. Variante completa da PAF-AH de <i>Danio rerio</i>	17
Figura 5. Variante completa da PAF-AH de <i>Mus musculus</i>	18
Figura 6. Biossíntese e degradação do PAF.....	19
Figura 7. Expressão do gene PLA2G7 em pacientes com câncer.....	24
Figura 8. Diagrama das interações entre Darapladib e a PAF-AH humana.....	26
Figura 9. Ciclo de Lands.....	29
Figura 10. Diagrama filogenético.....	38
Figura 11. Orientação da PAF-AH de <i>Danio rerio</i> em membrana.....	39
Figura 12. Sobreposição da PAF-AH de <i>Danio rerio</i> em humana.....	40
Figura 13. Melhor posição para NDEA em PAF-AH.....	41
Figura 14. Melhor posição para malathion em PAF-AH.....	42
Figura 15. Diagrama dos xenobióticos com PAF-AH humana.....	42
Figura 16. Reação da SER-273 da PAF-AH humana.....	43

GRÁFICOS.

Gráfico 1. Ramachandran geral para PAF-AH de <i>Danio rerio</i>	40
Gráfico 2. Inibição da Atividade Enzimática.....	45
Gráfico 3. Atividade Enzimática Bruta.....	45

TABELAS.

Tabela 1. Cronograma de atividades.....	37
Tabela 2. Sumário das interações entre ligantes e PAF-AH humana.....	44

Tabela 3. Interações entre principais substratos e PAF-AH humana.....	44
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PLA2	Fosfolipase A2
PLA1	Fosfolipase A1
PLA2-Lp	Fosfolipase A2 associada a lipoproteínas
iPLA2	Fosfolipases cálcio-independentes
PAF-AH	Acetil-hidrolase do fator de agregação plaquetária
PAF-AH2	Acetil-hidrolase hepática do fator de agregação plaquetária
cPLA2	Fosfolipase A2 citosólica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
HDL	Lipoproteína de alta densidade
DFP	Fluorofosfato de diisopropilo
CEHs	Hidrolases de éster carboxílico
ZIRC	Centro de pesquisas internacional em Zebra-Fish
PAFR	Receptor celular de PAF
Liso PC	lisofosfatidilcolina
oxNEFA	Ácido graxo não esterificado oxidado
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
FDA	Food and Drug Administration
NDMA	N-Nitrosodimetilamina
NDEA	N-Nitrosodietilamina
DDVP	Dimetildiclorovinilfosfato
RMSD	Raiz quadrada do desvio quadrático médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. A PAF-AH ou PLA2 associada a lipoproteínas.....	14
2.1.1. Genética e expressão.....	17
2.1.1.1. Funções fisiológicas da PAF-AH.....	18
2.1.1.1.1. Interação celular e substrato.....	20
2.1.1.1.1.1. Controle alostérico e lipoproteínas.....	21
2.2. Fisiopatologia.....	22
2.2.1. Inibidores e Terapias.....	25
2.3. Metabolismo de lipídios em peixes e ser humano.....	27
2.4. Ciclo de Lands e peroxidação lipídica.....	28
2.5. Meio ambiente e contaminantes.....	29
2.5.1. Nitrosaminas.....	30
2.5.2. Malathion-malaxon.....	31
3. ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	32
3.1. Ancoragem molecular e modelagem por homologia.....	32
3.2. <i>Danio rerio</i> como modelo <i>in silico</i>	32
4. TESTES <i>IN VITRO</i>	33
4.1. Camundongos suíços para testes <i>in vitro</i>	33
5. OBJETIVOS.....	33
5.1. Objetivo geral.....	33
5.1.1. Objetivos específicos.....	33
6. CRONOGRAMA.....	33
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34

7.1. <i>Mus musculus</i>.....	34
7.2. Coleta de sangue e eutanásia.....	34
7.3. Monitoramento enzimático.....	35
7.4. Tratamento dos dados e análise estatística.....	36
7.5. Modelagem molecular e <i>docking</i>.....	36
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
9. CONCLUSÃO.....	46
10. BIBLIOGRAFIA.....	47

1. INTRODUÇÃO

A extensa literatura trata da atividade fosfolipásica de enzimas citosólicas e secretórias de enzimas do tipo PLA2 (phosfolipase A2) como potencial precursora de cascatas oxidativas em organismos vivos, geralmente culminando no aumento da produção de ácido aracdônico. A PLA2 secretória ligada a lipoproteínas (PLA2-Lp) ou acetil-hidrolase do fator de agregação plaquetária (PAF-AH) pertence ao grupo enzimático específico VII da superfamília PLA2 e, assim como suas variações, trata-se de uma hidrolase de grupos funcionais acetila presentes na posição sn-2 de fosfolipídeos. Sua importância metabólica remonta todo o espectro nutricional de lipídeos, desde a assimilação celular, até processos de catabolismo e biossíntese.

Muitos estudos recentes investigam as relações entre as fosfolipases e distúrbios do metabolismo, obesidade, doenças cardiovasculares, hepáticas e entre as mais variadas síndromes, como consta na revisão recente de Huang, Wang e Shen (2019). Em via de regra, as atividades enzimáticas da PLA2-Lp vêm sendo vinculadas à geração de produtos metabólicos com efeitos deletérios e inflamatórios nos mais variados tecidos do organismo e a comunidade científica busca mapear tais características e seus respectivos proponentes moleculares.

Mesmo assim, as funções da PLA2-Lp no metabolismo de lipídios ainda não foram completamente compreendidas e envolvem uma série de mecanismos complexos de regulação e translocação desta enzima para membranas (MOUCHLIS; DENNIS, 2019). Nesta área encontram-se lacunas experimentais e teóricas a respeito dos papéis metabólicos que estas enzimas desempenham, bem como as suas relações de interação com toxinas, moléculas inibidoras e biomarcadores.

Este panorama reforça a necessidade de uma abordagem multidisciplinar na investigação da sua estrutura e função, na qual a modelagem *in silico* pode ser explorada para conduzir a busca por esclarecimento científico.

Buscando sondar uma das fronteiras desta área de pesquisa, trago esta dissertação, que associa o conhecimento adquirido sobre as PLA2-Lp nas últimas décadas com as perspectivas da modelagem *in silico* aplicada às interações toxicológicas entre esta enzima e alguns contaminantes ambientais emergentes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A PAF-AH ou PLA2 associada a lipoproteínas

As acetil-hidrolases do fator de ativação plaquetário (PAF-AH) são fosfolipases A2 cálcio-independentes presentes em complexos com LDL e HDL, que podem hidrolisar um éster acetil na posição sn-2 de lipídeos oxidados, dentre eles o fator de agregação plaquetária (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, PAF). A reação de neutralização do PAF pela PAF-AH pode ser expressa a seguir:

1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina + H₂O



Figura 1. Reação de catálise do PAF.

Até o presente momento e em mamíferos foram identificados quatro tipos de PAF-AH. Um dos tipos é secretado pela célula e atua em nível plasmático, a PAF-AH secretória ou PLA2 associada a lipoproteínas (PLA2-Lp), que apresenta alta homologia genética com a PAF-AH hepática de tipo II (PAF-AH2), ambas compõem o grupo VII. Os outros dois tipos são reconhecidas por atuar em nível intracelular e são denominadas como [PAF-AH (I) e PAF-AH (II)], ou PLA2 do grupo VIII (KONO; ARAI 2015).

A PAF-AH plasmática é capaz de hidrolisar uma gama de fosfolípidos com ácidos graxos oxidados modificados, o que dentre outros fatores revela multifuncionalidade adaptativa desta enzima (HUANG; WANG; SHEN, 2019). Uma característica que não é consensual para as demais PAF-AH intracelulares (VIII), que tendem a ser mais específicas para PAF (MCINTYRE; PRESCOTT; STAFFORINI, 2009; QUACH; ARNOLD; CUMMINGS, 2014). Além disto, PLA2-LP é uma molécula amplamente N-glicosilada que pode ser inibida por inibidores conhecidos, tais como o fluorofosfato de diisopropilo (DFP) como já evidenciado por Carpenter et al. (2001).

A PLA2-Lp apresenta um grau mais alto de homologia com outras lipases e esterases neutras do que com outros membros da superfamília da fosfolipase A2, possuindo relativamente menos isoformas e menor peso molecular que as PLA2 cálcio-independentes (iPLA2) e PLA2 citosólicas (cPLA2) por exemplo. Por estes motivos é considerada uma lipase do subtipo esterase. De fato, seu modelo cristalográfico a 1,5 Å

mostra uma dobra clássica de lipase α /beta-hidrolase e uma tríade catalítica conservada composta por uma serina, um resíduo de aspartato e um de histidina (SAMANTA; BAHNSON, 2008).

Inicialmente, esterases e lipases são proteínas que apresentam um enovelamento denominado alfa/beta hidrolase que consiste em uma folha central β e embalada entre duas camadas de α -hélices. Geralmente estas enzimas apresentam uma tríade catalítica compostos por um resíduo nucleofílico (serina, aspartato ou cisteína), uma histidina, um ácido catalítico (aspartato ou glutamato), e dois ou três resíduos de glicina. Apesar de apresentarem os mesmos enovelamentos proteicos e a mesma maquinaria catalítica central, estas enzimas catalisam uma gama diversa de mecanismos de reação enzimática e muitas podem trabalhar com vários substratos parecidos, podendo ser agrupadas dentro do grande grupo das hidrolases (DIMTRIOU et al., 2017; BAUER; BUCHHOLZ; PLEISS, 2019). Ao longo da evolução molecular, várias sequências de resíduos de aminoácidos foram inseridas, preservando a dobragem da hidrolase alfa/beta e mantendo assim a estabilidade do sítio ativo de uma grande variedade de enzimas, tais como as hidrolases de éster carboxílico (CEHs) (NARDINI; DIJKAstra, 1999; BAUER; BUCHHOLZ; PLEISS, 2019; DENESYUK et al., 2020).

A PLA2-Lp humana tem massa de aproximadamente 45 Kilodaltons e é considerada hidrofóbica, embora possua características bioquímicas mistas (anfipática). A sequência de aminoácidos gerada por uma das suas variantes de mRNA pode ser acessada pelo código Q13093 no site Uniprot (2023) e segue:

```
MVPPKLHVLFCCLCGCLAVVYPFDWQYINPVAHMKSSAWVNKIQVLMAAASFGQTKIPRGN  
GPYSVGCTDLMFDHTNKGTFRLRYPSQDNDRLDTLWIPNKEYFWGLSKFLGTHWLMGN  
ILRLLFGSMTTPANWNSPLRPGEKYPLVVFHSHGLGAFRTLISAIGIDLASHGFIVA AVEHRD  
RSASATYYFKDQSAAEIGDKSWLYLRTLKQEEETHIRNEQVRQRAKECSQALSLILDIDHG  
KPVKNALDLKFDMEQLKDSIDREKIAVIGHSFGGATVIQTLSEDQRFRCGIALDAWMFPLG  
DEVYSRIPQPLFFINSEYFQYPANIIKMKKCYSPDKERKMITIRGSVHQNFADFTFATGKIIG  
HMLKLKGDIDSNVAIDL SNKASLAFLQKHLGLHKDFDQWDCLIEGDDENLIPGTNINTTNQ  
HIMLQNSSGIEKYN
```

Figura 2. Sequência completa de 441 aminoácidos da PAF-AH humana.

A cristalografia por difração de raios x e testes *in vitro* com PLA2-Lp humana, murínica, suína e bovina encontram uma média de massa para a enzima de 40-45 KDa e conferem sua atividade catalítica ao sítio ativo contendo os aminoácidos Serina, Histidina e Ácido Aspartico. No caso da PLA2-Lp humana, a Ser273 está localizada no N-terminal

de uma alfa-hélice e no complexo característico de lipases “GXSG”. O Asp296 está no C-terminal de uma folha-beta e a His351 localiza-se no N-terminal de uma α -hélice (SAMANTA;BAHNSON, 2008). Esses resíduos estão alocados, como em outras lipases, num “bolsão” hidrofóbico catalítico orientado para o substrato lipídico como representado a seguir:

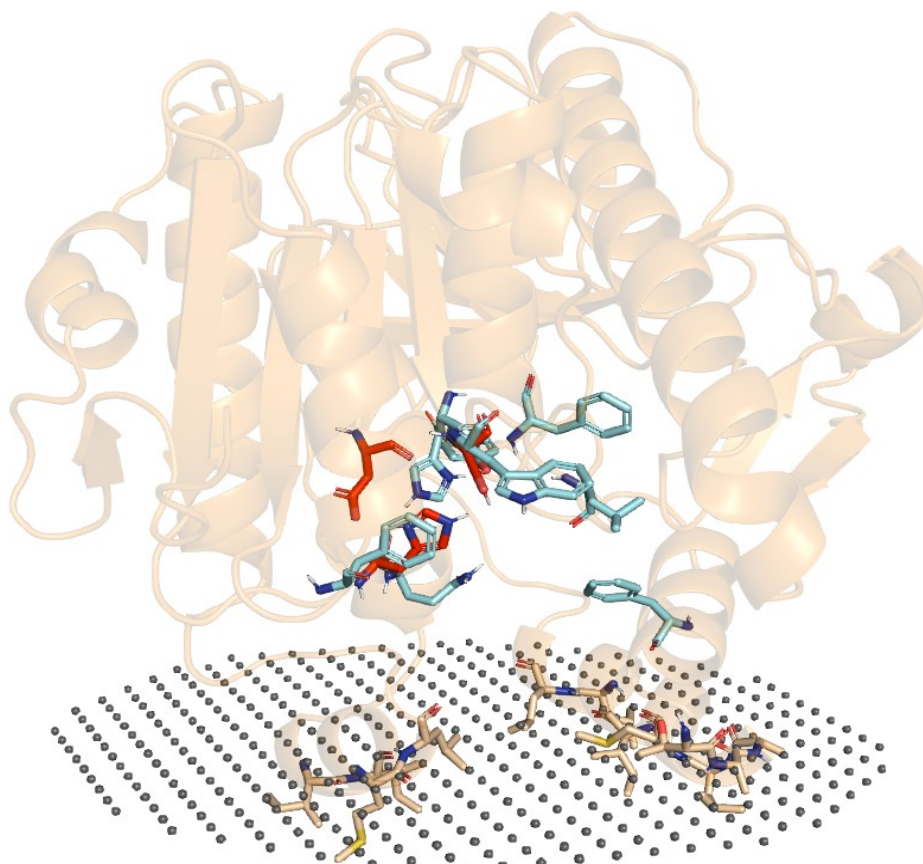


Figura 3. Orientação da PAF-AH de *Homo sapiens* em membrana. Tríade catalítica (vermelho) – Ser273; Asp296; His351 - Resto do sítio ativo (ciano) – Trp298; Phe322; Phe274; Leu153; His272; Tyr160; Phe110; Gln352 - Interface membrana (amarelo) – Thr113; His114; Trp115; Leu116; Met117; Ile120; Leu123; Leu124; Ile364; Ile365; Met368; Leu369.

No caso do zebrafish (nosso modelo de organismo para estudos *in silico*) a literatura registra ao menos dois grandes grupos de PLA2: as intracelulares, como as PLA2 citosolicas (cPLA2) e as PLA2 associadas a lipoproteínas (PLA2-Lp) (HUANG et al., 2014). Ambos acompanham uma grande lacuna de conhecimento envolvendo suas funções fisiológicas e conformações estruturais. Não obstante, a PAF-AH secretória de *Danio rerio* apresenta, segundo bancos de dados livres, homologia sequencial com mais de 55% de identidade em resíduos aminoácidos com a PAF-AH humana, e mais de 47,5% de identidade com a PAF-AH de caundongos (*Mus musculus*), o que a torna um

alvo bastante promissor para simulações de *docking* e modelagem computacionais, bem como ensaios *in vitro* e *in vivo*, que detalharemos ao longo do trabalho.

A sequência de aminoácidos da PLA2-Lp fornecida pelo centro de pesquisas internacional em Zebra-Fish (ZIRC) para uma de suas variantes completa está disponível no site Uniprot (2023) pelo código Q5RHM0:

```
MCSVGRVLVQLTLVKRVYEWKSTSGLQFIPKKWNWFCVIAMGNSSGHNNTMTIPP GKGP
HQVGCTDLMVGHTVQGT FMRIYYPCQATEHPHLPDWVPCREYFNGLADFMKINRALSER
IFNYLFGSCKIPAAWNASFKPDGKYPVIFSHGLGAFRTLYSAICVELASQGFIVA AVEHRDE
SSSATFYFKENAEPGTRHMSDDISKPVSDNLEEVWMYRPLKTGENEFPLRNKQVKQR
ADECIRALDILFDIHSGKSVENVLQSNFDLSTMENSMDLCRIAVMGHSFGGATVIECLCKE
VRFKCGVALDTWMFPLDEEIFPGVKQPIFFINSEKFQWIGNIIRMKKLDSAIFPRKMITIKGT
VHQSFDPDFTFLTGNWIGRLMKLKG EIDPHIALDLCKATLAFLQRHLSLNRDFNQWDPLIE
GKDDNLIPGTNITIPHSSI
```

Figura 4. Variante completa de 444 aminoácidos da PAAF-AH de *Danio rerio*.

A sequência de aminoácidos da PLA2-Lp de *Mus musculus* está disponível no site Uniprot (2023) pelo código Q60963:

```
MVPLKLQALFCLLCCLPWVHPFWQDTSSFD FRPSVMFHKLQSVMSAAGSGHSKIPKG
NGSYVVGCTDLMFGYGNESVFVRLYYPAQDQGR LDTVWIPNKEYFLGLSIFLGTPSIVGNI
LHLLYGSLTTPASWNSPLRTGEKYPLIVFSHGLGAFRTIYSAIGIGLASNGFIVATVEHRDRS
ASATYFFEDQVAAKVENRSWLYLRKVKQEESESVRKEQVQQRAIECSRALSAILDIEHGD
PKENVLGSAFDMKQLKDAIDETKIALMGHSFGGATVLQALSEDQRFRCGVALDPWMYPV
NEELYSRTLQPLLFINSAKFQTPKDIAMKKFYQPDKERKMITIKG SVHQNFDDFTFVTGKII
GNKLT LKGEIDSRVAIDLTKASMAFLQKHLGLQKDFDQWDPLVEGD DENLIPGSPF DAVT
QVPAQQHSPGSQTQN|
```

Figura 5. Variante completa de 440 aminoácidos da PAF-AH de *Mus musculus*.

Todas as proteínas utilizadas para testes neste estudo, portanto, são pertencentes ao grupo VII - extracelular, possuem massa correspondente (45 a 50 Kilodaltons) e uma alta similaridade sequencial.

2.1.1. Genética e expressão

O gene que codifica a proteína PLA2-Lp humana é o PLA2G7, composto por 12 exons e o polimorfismo deste gene implica distintas modificações na atividade enzimática. A relação genômica com a expressão e atividade da PLA2-Lp foi abordada no passado por numerosos ensaios associando função, polimorfismo e consequências clínicas (majoritariamente atreladas a doenças cardio-cerebro-vasculares), que foram

sumarizadas por Stafforini (2009), sendo que em diversas doenças o aumento da expressão deste gene pôde ser constatada, bem como algumas correlações associadas ao tipo de polimorfismo característico (isoformas).

No que diz respeito às influências destas alterações genéticas na proteômica, estima-se que sejam capazes de explicar de 37% a 62% das variações de atividade observadas na PLA2-Lp na população (LENZINI et al., 2009; RAHMAN et al., 2011).

Porém, devido à contradição destes e outros resultados em estudos de larga escala, a implicação clínica do polimorfismo na atividade da PLA2-Lp está sendo confrontada com estudos genéticos mais específicos, enquanto uma nova perspectiva sobre controle genético ainda está por vir (HUANG; WANG; SHEN, 2019).

Ainda assim, notoriamente a expressão do mRNA correspondente a esta enzima foi observada como relativamente elevada em tecidos com presença contundente de macrófagos. Atualmente a transcrição do PLA2G7 foi evidenciada como intimamente dependente de fatores de transcrição da família Sp sendo que estão submetidos a um controle bastante refinado (WU et al. 2003).

2.1.1.1 Funções fisiológicas da PAF-AH

O Fator Ativador de Plaquetas (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) é um mediador lipídico de inflamação que se sinaliza através de um receptor celular transmembrana associado à proteína G (PAFR), que é expresso nas membranas plasmáticas e nucleares de diversos tipos celulares (SHUKLA, 1992). O PAF é um fator crucial para vários processos inflamatórios, incluindo modulação plástica de células envolvidas no processo de defesa. Além disto, a PAF-AH inativa o PAF e fosfolípidos semelhantes, controlando suas ações.

O PAF pode ser produzido por meio de dois eventos celulares distintos que envolvem a remodelação de fosfolípidos de membrana e síntese de novo da PAF. Na primeira etapa os fosfolípidos ricos em colinas (fosfatidilcolina) são hidrolisados na posição sn-2, liberando o ácido araquidônico (AA) e o lisofosfolípido (LPC), pela ação da PLA2 citosólica. Esta reação é favorecida frente a estresse oxidativo, que leva à peroxidação lipídica durante eventos como processos inflamatórios (TRAVERS, 2020; TRAVERS et al., 2021; ASHRAF; NOOKALA, 2022). O ácido araquidônico desta forma originado segue a rota da COX-1 (Ciclooxigenase constitutivo) e o LPC é transferido para a acetil-CoA e lisoPAF-acetil-transferase, que gera, então, o PAF. Já a via alternativa de

síntese do PAF ou via de novo, envolve várias outras etapas bioquímicas decorrentes da manutenção da homeostase (SNYDER, 1989; TSELEPIS et al., 2002; SUN et al., 2014; SATO; TAKETOMI, 2016; ASHAF; NOOKALA, 2022). O esquema a seguir resume estas reações:

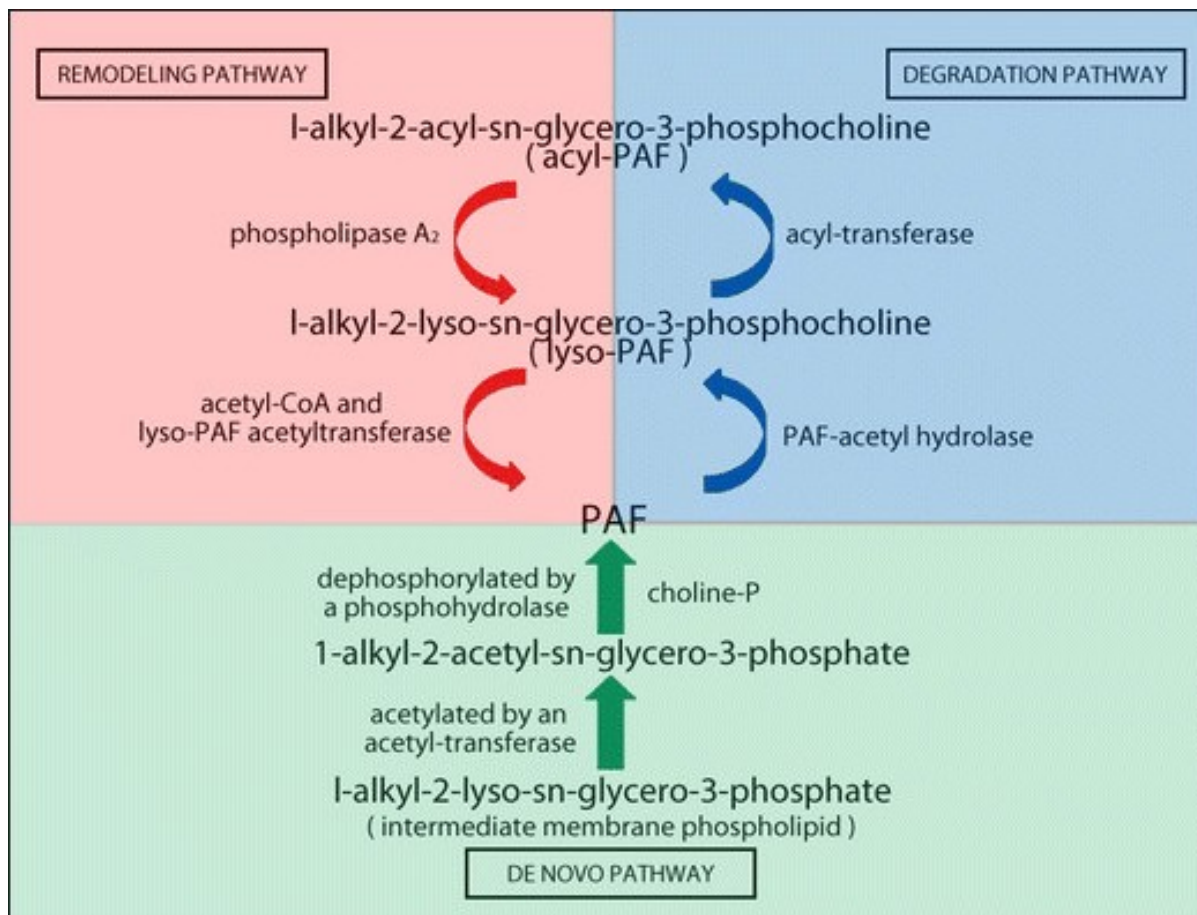


Figura 6. Biossíntese e degradação do PAF. Fonte: LIU et al. (2016).

Assim, uma das primeiras atividades desempenhadas pela PLA2 associada a Lipoproteínas seria neutralizar o excedente patológico de PAF, comportando uma de suas funções regulatórias e que pode, por meio de estímulos fisiopatológicos, refletir flutuações em suas concentrações. Como peixes são animais extremamente susceptíveis às condições da água, xenobióticos pró-oxidantes têm o potencial de causar mudanças nas vias metabólicas de lipídeos e por conseguinte gerar alteração na expressão e atividade da PAF-AH.

No entanto, a PLA2-Lp é encontrada em baixa quantidade no plasma, representando apenas um pequeno percentual de complexos com lipoproteínas. Em mamíferos, incluindo o homem, esta porção de enzimas está associada majoritariamente ao

subconjunto de partículas de LDL, que podem ter sua proporção afetada como resultado do curso de doenças metabólicas ou processos inflamatórios.

Por outro lado, esta última atividade benéfica também é responsável na patogênese da aterosclerose, já que a neutralização do PAF gera dois mediadores pró-inflamatórios: lisofosfatidilcolina (lisoPC) e ácido graxo não esterificado oxidado (oxNEFA). LisoPC e oxNEFA ligam-se à G2A, receptor acoplado à proteína G que é altamente expresso por macrófagos em lesões ateroscleróticas (COJOCARU et al., 2010; FATEMI et al., 2019).

Adicionalmente, mediadores pró-inflamatórios, incluindo o próprio PAF, podem recrutar e ativar leucócitos, prejudicar a depuração de células mortas e induzir a apoptose, o que faz com que a PLA2 associadas a lipoproteínas, enfoque deste projeto, tenha sido associada a várias doenças cardiovasculares e de natureza alérgica (CASTRO FARIA NETO et al., 2005; STAFFORINI, 2008; MACINTYRE et al., 2009; ASHRAF; NOOKALA, 2022).

Não obstante, a princípio, é esperado que a PLA2-Lp tenha algum papel protetor na neutralização do estresse oxidativo (MCCALL et al., 1999; CARLQUIST et al., 2007; COJOCARU et al., 2010; FATEMI et al., 2019).

2.1.1.1 Interação celular e substrato

Considera-se que as células hematopoiéticas (e derivadas) são as maiores responsáveis pelos níveis plasmáticos de PLA2-Lp circulante, e que diversos outros tecidos, como hepatócitos, células da aorta e adipócitos sejam fontes adicionais desta enzima secretória (STAFFORINI et al., 2008; CAO et al., 1998) .

Como citado anteriormente, a PAF-AH plasmática possui especificidade de substrato bem ampla, mas com funcionalidade restrita, capaz de diferencialmente reconhecer resíduos sn-2 a serem hidrolisados. Seu rendimento varia de composto para composto, mas pode ser bastante elevado dependendo do fosfolípídeo a ser catabolizado. Em algumas condições, a PLA2-LP pode ainda exercer função de PLA1, removendo o resíduo sn-1 de fosfolípídeos, bem como pode realizar papel de transferase, realocando grupos acetila originados do PAF para lisofosfolípídeos com ligações éster ou éter, como consta na atualização de Kono e Arai (2019).

Dito isto, a relação da PLA2-Lp com os diversos tipos de substratos ainda não foi completamente esclarecida, sendo que o seu acoplamento com lipídeos oxidados pode

ocorrer tanto na fase membranar, quanto na fase diluída, embebida em plasma (KONO; ARAI, 2019).

Dentre outras razões, tal amplitude de atuação infere que possa desempenhar formação de uma variedade de metabólitos extracelulares capazes de gerar necrose e barreiras endoteliais, dentre outras cascatas oxidativas (e.g espécies peroxidadas). No entanto, estudos *in vitro* mostram a sua preferência por fosfolipídeos e fosfatidilcolinas bastante oxidados (ANDROULAKIS et al., 2005), dado que sua especificidade pode estar relacionada à conformidade de fosfolipídeos na membrana plasmática das células em que atua (CAO et al., 2011).

2.1.1.1.1. Controle alostérico e lipoproteínas

A PLA2-Lp possui maior afinidade por frações de LDL de baixíssima densidade ou eletronegatividade e por frações de lipoproteínas-1 muito densas (VHDL-1), mas pode ser transportada por outros tipos de lipoproteínas séricas a depender de fatores eletrostáticos (SRINIVASAN et al., 2010). Extraordinariamente, a enzima possui a capacidade de migrar de frações LDL para as de HDL (STAFFORINI et al., 2000), o que pode representar uma funcionalidade alternada, capaz de gerar efeitos opostos no que diz respeito ao metabolismo lipídico e à preservação de tecidos, como os de endotélio.

A parte estrutural da PLA2-Lp que confere a ligação às lipoproteínas em humanos foi identificada como a interface gerada por duas pequenas alfa-hélices da proteína (CAO et al., 2011) correspondentes aos resíduos: Tyr205, Trp115, Leu116 e Met117. Todos eles partem do nitrogênio terminal de alfa-hélice. Já outros resíduos coadjuvantes remontam ao carbono terminal de alfa-hélice (His367 até Lys370). Estes resíduos costumam variar bastante o grau de conservação, como visto em nosso modelo de *Danio rerio* (Figura 12). Além do mais, fatores como a polaridade de aminoácidos constituintes carregados e eventos de glicosilação enzimática, devem influenciar bastante a interface de ligação.

A maior afinidade por resíduos LDL de baixíssima densidade e lipoproteínas do tipo A devem-se por dedução à apolipoproteína B100, presente em LDL. Essa proposição trata da PLA2-Lp como uma enzima com funcionalidade bastante atrelada ao pH do meio extracelular (aproximadamente 7,4). A modelagem desta enzima, portanto, deve levar bastante em consideração as interações eletrostáticas com ligantes.

Em geral esta enzima possui atividade dependente das concentrações de colesterol nas membranas e seu controle de recrutamento depende dos tipos de fosfolípidos oxidados presentes em LDL ou HDL, evidenciando um tipo próprio de controle alostérico (PANDE et al., 2011; MOUCHLIS et al., 2022).

Mesmo assim, são muitas as variáveis que influenciam o tipo de atividade predominante da PLA2-Lp, dentre elas o tempo metabólico, a composição das membranas celulares, a interface lipoproteica com o substrato, o tipo de substrato predominante no organismo e finalmente o tipo de organismo estudado. Sabe-se que a expressividade da PLA2-Lp é espécie-específica e diferenças em suas sequências de aminoácidos e conformidades estruturais, por mais que minuciosas, a depender da porção proteica em que se dão, podem gerar modificações de bioatividade consideráveis. Nesse âmbito, investigações evolutivas e análises de homologia entre PLA2-Lp nos diversos grupos de vertebrados foram fundamentais (Figura 10).

Em suma, muitos estímulos exógenos são capazes de alterar drasticamente a funcionalidade da PLA2-Lp em humanos. Com destaque para aqueles envolvidos em processos imunológicos, como interferons, interleucinas e fatores de estímulo leucocitário (CAO et al., 1998). Hormônios esteroides e a presença de antígenos também alteraram a dinâmica catalítica da PLA2-Lp.

2.2. Fisiopatologia

Dado a dificuldade de realizarem-se ensaios clínicos em humanos com tamanhas variáveis a serem isoladas, uma boa parcela dos estudos que utilizam essa abordagem associada a inibidores de PLA2-Lp falharam em produzir resultados conclusivos, o que deve redirecionar as pesquisas para testes em animais. Em contrapartida, alguma base de conhecimento já foi estabelecida através de estudos com fisiopatologias específicas e serão descritas brevemente nesta seção:

Arteriosclerose

Atualmente os níveis séricos de PLA2-Lp são considerados importantes biomarcadores cardiovasculares. As inferências causais entre esses níveis e ocorrência de eventos cardiovasculares, porém, não foram provadas até o momento e testes com inibidores não atingiram os objetivos esperados terapêuticos (o que será detalhado na próxima seção).

Porém, modelos de análise laboratorial de níveis séricos de PLA2-Lp foram propostos para acompanhamento de pacientes com algumas condições cardiovasculares específicas, já que a correlação entre estas doenças e a enzima foi estabelecida em diversos estudos (GARZA et al., 2007; STEFANO et al., 2019). Estes modelos, inclusive, levaram a agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) a aprovar em dezembro de 2014 o uso de teste PLAC®(diaDexus Inc, San Francisco, CA, USA) para a determinação de atividade enzimática de PLA2-Lp para a prevenção de cardiopatias na prática medicinal.

Alzheimer

A investigação sobre a interação entre a PLA2-Lp e a doença de Alzheimer parte do pressuposto de que a especificidade da enzima com dinâmicas cardiovasculares deve influenciar direta ou indiretamente a estrutura endotelial especializada do cérebro (BBB).

A permeabilidade e integridade desses vasos sanguíneos está casualmente relacionada ao desenvolvimento da doença de Alzheimer e estudos epidemiológicos com PLA2-Lp em humanos e outros mamíferos têm reiterado essa afirmação, como evidenciado por Maher-edwards *et al.* (2015) .

Estudos recentes baseados na inibição seletiva da PLA2-Lp, no entanto geraram resultados controversos, sendo que ensaios de fase II com portadores de doença de Alzheimer e doença coronariana submetidos a tratamento com rilapadib (outro forte inibidor de PLA2-Lp) não demonstraram redução em marcadores neurodegenerativos plasmáticos, mas produziram efeitos positivos na cognição dos participantes.

Ao que tudo indica, ainda não é possível determinar ao certo as relações entre esta enzima e problemas neurodegenerativos, mas pode-se deduzir que sua inibição deva contribuir para uma correção estrutural de capilares cerebrais em alguns casos, já que um aumento na sua expressão possivelmente leva a maiores riscos de desenvolvimento e piora de quadros de demência.

Cânceres

Níveis de PLA2-Lp em alguns tecidos tumorais são bastante elevados em comparação a tecidos saudáveis (LEHTINEN et al., 2017). Muitos desses tumores, como de mama, cólon, pulmão, rins e fígado apresentam maior expressividade do gene PLA2G7 quando atingem estágio invasivo e de metástase.

A dinâmica patogênica oncológica da PLA2-Lp é ainda bastante nebulosa, gerando evidências de papéis de atuação completamente opostos. Essa visão reitera o caráter multifatorial da enzima tanto quanto a diversidade de microambientes dos tantos tipos de cânceres. Sobre isto, importantes revisões demonstraram que a identidade do efeito tumorigênico da PLA2-Lp é definitivamente controlado pela regulação de bioatividade de fosfolipídeos no organismo. Sendo fundamental para o avanço ou regressão de processos tão relevantes quanto proliferação celular de tumores, invasão e metástase, apoptose e angiogênese.

Relações entre a atividade enzimática e macrófagos associados a tumores também foi documentada, e a expressão do gene codificante PLA2G7 nestas células pode ser um bom alvo de estudos ao analisar melanomas e toxicidade autoimune, por exemplo, como mostra a relação da figura a seguir retirada de banco de dados livre:

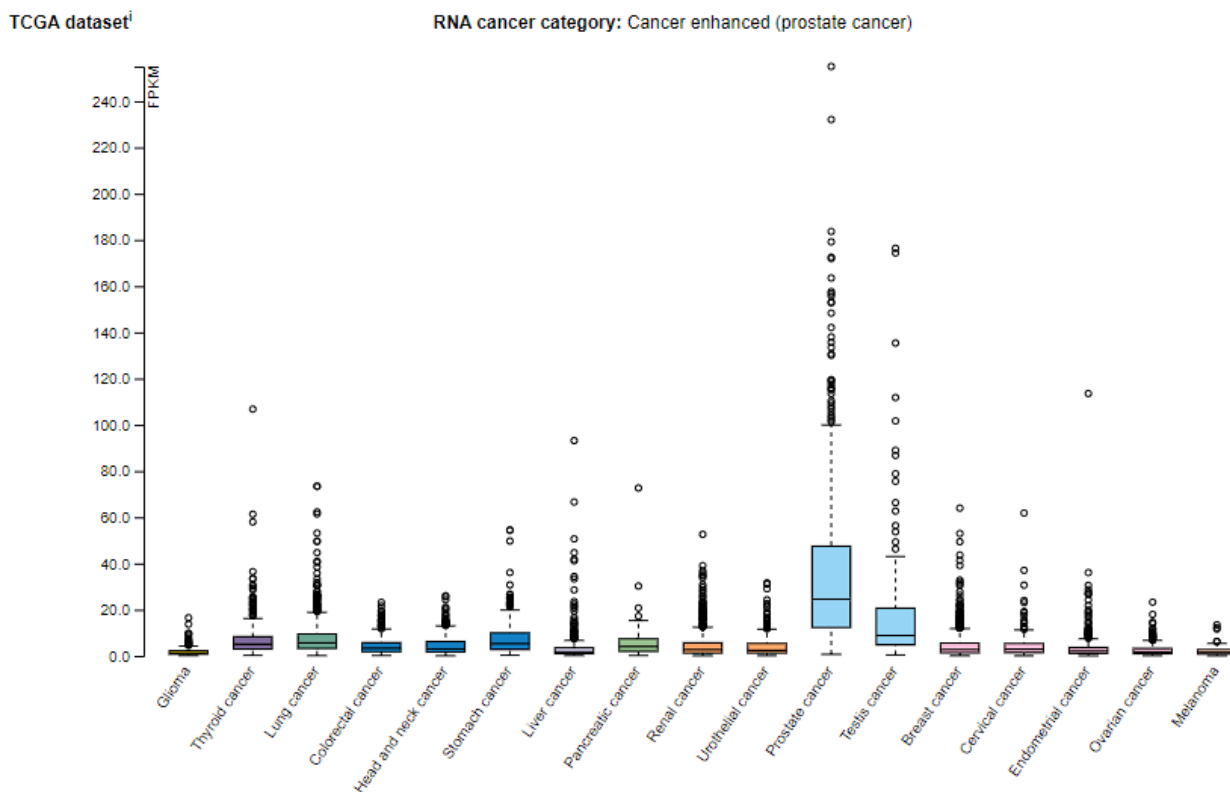


Figura 7: Expressão do gene PLA2G7 (em RNA) em pacientes com câncer. Fonte: Sjöstedt et al. (2020).

Em geral, o papel protumorigênico da PLA2-Lp em alguns tipos de cânceres (como no caso do câncer de próstata) são alvos em potencial para alternativas terapêuticas, mas sua inibição pode ter efeitos inesperados, uma vez que a atividade da enzima também parece exercer função protetora em muitos casos.

Esquizofrenia

Recentemente duas hipóteses ganharam notoriedade ao tentar explicar a origem da esquizofrenia. As hipóteses podem estar interligadas e ambas envolvem o metabolismo de lipídios oxidados, e portanto as vias enzimáticas da PLA2-Lp (LIU et al., 2022):

A primeira hipótese estabelece uma relação causal entre um sistema de enzimas lipolíticas e lipogênicas falho e a deficiência na produção de prostaglandinas (consideradas também mediadores de transmissão de sinapses). E a segunda aponta a degradação excessiva de glicerofosfolipídeos ou mudanças nas composições de glicerofosfolipídeos de membrana como precursoras da doença.

Diabetes

A modulação de PLA2-Lp pela insulina precisa ser melhor investigada antes de ser mapeado um modelo consistente de interação e efeito terapêutico para indivíduos portadores de diabetes. No entanto, alguns estudos mostram que a atividade de PLA2-Lp pode ser um bom biomarcador para síndromes metabólicas em pacientes com diabetes tipo II (NOTO et al., 2006).

2.2.1. Inibidores e terapias

Embora a PAF-AH ou PLA2-Lp esteja relacionada a uma resposta fisiológica ao estresse oxidativo, estranhamente componentes como metais pesados e radicais de oxigênio (e.g Peroxinitrito) foram identificados como inibidores da PLA2-Lp, enquanto que algumas destas moléculas são inclusive capazes de impedir a sua ligação com o LDL, mecanismo que pôde ser abordado primariamente através de dinâmica molecular baseada em modelagens *in silico* (GURUNG et al., 2018).

Basicamente três inibidores sintéticos da PLA2-Lp foram desenvolvidos nas últimas décadas e progrediram para pesquisa clínica. Com destaque para o composto sintético darapladib que chegou à fase III em ensaios clínicos, mas não obteve sucesso na redução de eventos cardiovasculares em pacientes com síndrome coronariana aguda (CAMPOS et al., 2014). O darapladib (desenvolvido pela GSK) pode ser encontrado na plataforma do PUBCHEM com a seguinte fórmula molecular: C₃₆H₃₈F₄N₄O₂S. Para

melhor apreciação das interações deste composto com a PAF-AH humana, foi feita uma simulação *redocking* que gerou as interações a seguir:

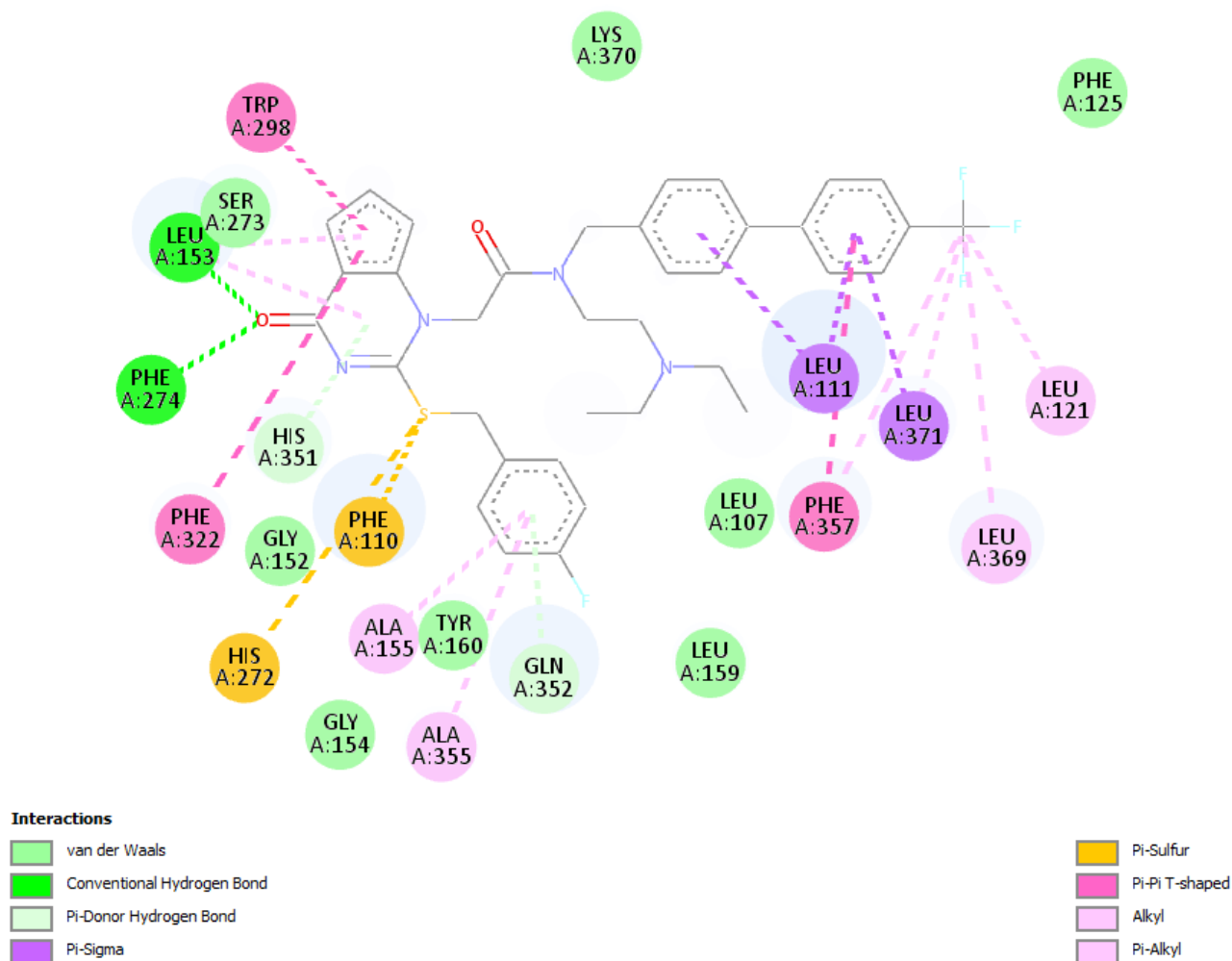


Figura 8: Diagrama de interações do *redocking* entre PAF-AH humana (resíduos coloridos) e Darapladib (composto estrutural).

Dentre os principais proponentes das pesquisas farmacológicas temos: análogos de PAF, derivados de pirimidona (como o darapladib), compostos do tipo biaril (dois anéis aromáticos estruturais), lactama (com amida cíclica), sulfonamida (amidas derivadas de ácidos sulfônicos), entre outros.

2.3. Metabolismo de lipídios em peixes e ser humano

A absorção lipídica em peixes é, de maneira geral, bastante similar à dos mamíferos, sendo que ácidos graxos poliinsaturados costumam ser mais bem aproveitados energeticamente quando comparados com os saturados e monoinsaturados. Em trutas, *Oncorhynchus mykiss*, por exemplo, o transporte de triacilglicerídeos e fosfolipídeos depende majoritariamente do LDL e HDL circulantes (BLANCHET *et al.*, 2005), lipoproteínas que, como visto, são as maiores formadoras de complexos com PLA2-Lp em humanos.

Na piscicultura e na natureza, considera-se que a biodisponibilidade de energia aos peixes está diretamente associada à qualidade desses lipídeos na dieta e nas modificações oxidativas às quais são submetidas. Desta forma, é facilmente reconhecível que a constituição de lipídios em peixes afeta as cadeias tróficas de maneira singular, relacionando-se intimamente à qualidade do consumo de carne de peixe pela população humana, principalmente aquelas que fazem da pesca sua subsistência.

Peixes, como os demais animais, dentre eles o homem, são incapazes de produzir endogenamente famílias ômega-9, ômega-6 e ômega-3. A biossíntese desses ácidos graxos só é possível através de ingestão de ácidos oleico, linoleico e alfa-linolênico essenciais e sua conversão e acumulação tecidual deve ser mediada por uma série de enzimas envolvidas no controle lipídico.

No que diz respeito a esse tema, contudo, poucos avanços foram reconhecidos. Boa parte da literatura voltada à nutrição e manejo de peixes (principalmente amazônicos), como em Silva (2017), sugere a ampliação de investigações enzimáticas que possam potencializar os benefícios já observados induzidos pela ingestão e biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs).

Com destaque, ácidos graxos ômega-3 previnem doenças justamente por competirem na mesma via enzimática que o ácido araquidônico, levando a respostas imunológicas menos agressivas e de potencial inflamatório menor. Essa via de atuação relaciona-se com a redução de mediadores inflamatórios lipídicos, dentre eles o PAF que é o principal substrato da PLA2-Lp e a lisofosfatidilcolina (lisoPC), produto da reação catalisada por ela.

2.4. Ciclo de Lands e peroxidação lipídica

O estresse oxidativo está intimamente ligado a produção de espécies reativas de oxigênio e é universalmente reconhecido como um ponto chave para a origem de várias patologias e doenças crônicas que têm a inflamação como plano de fundo (MCGARRY et al., 2018).

Consequência direta do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), quando superada a capacidade antioxidante total, é a oxidação de lipídeos, principalmente os poliinsaturados (PUFAs) que estão presentes também nas membranas celulares. Outro efeito principal das EROs é a peroxidação lipídica, que ocorre quando os fosfolipídios da membrana são postos em contato com um agente oxidante das EROs. Na reação resultante deste encontro, o radical livre oxida uma cadeia lipídica insaturada, levando à formação de um lipídio hidroperoxidado e um radical alquila. Essa lipoperoxidação resulta em alterações da estrutura da membrana, afetando sua fluidez e prejudicando sua integridade (JUAN et al., 2022).

As membranas biológicas são remodeladas constantemente via ciclo de Lands (Figura 1), a Fosfolipase A2 (cPLA2) remove ácidos graxos poli-insaturado da posição sn-2, que resulta na formação PAF e Ácido Araquidônico (AA) e a velocidade deste ciclo e da cPLA2 pode ser incrementada por espécies reativas de oxigênio e pelo estresse oxidativo, levando a um aumento da produção deste ácido e eicosanoides, dentre mediadores pró inflamatórios diversos (WU et al., 2016 e ADEBIYI et al., 2019). Nesta via a lisofosfatidilcolina, é acetilada por uma acetil-transferase (Liso-PAFAT) para formar PAF (KONO; ARAI, 2019).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) nos fosfolípidos são bioativos e passam pelo "ciclo de desacilação-reacilação", também conhecido como o "ciclo Lands". Este ciclo permite que os PUFAs sejam liberados dos fosfolipídios através das fosfolipases A2 (PLA2s) e posteriormente retornem aos fosfolipídios de membrana através das lisofosfolipídios-aciltransferases:

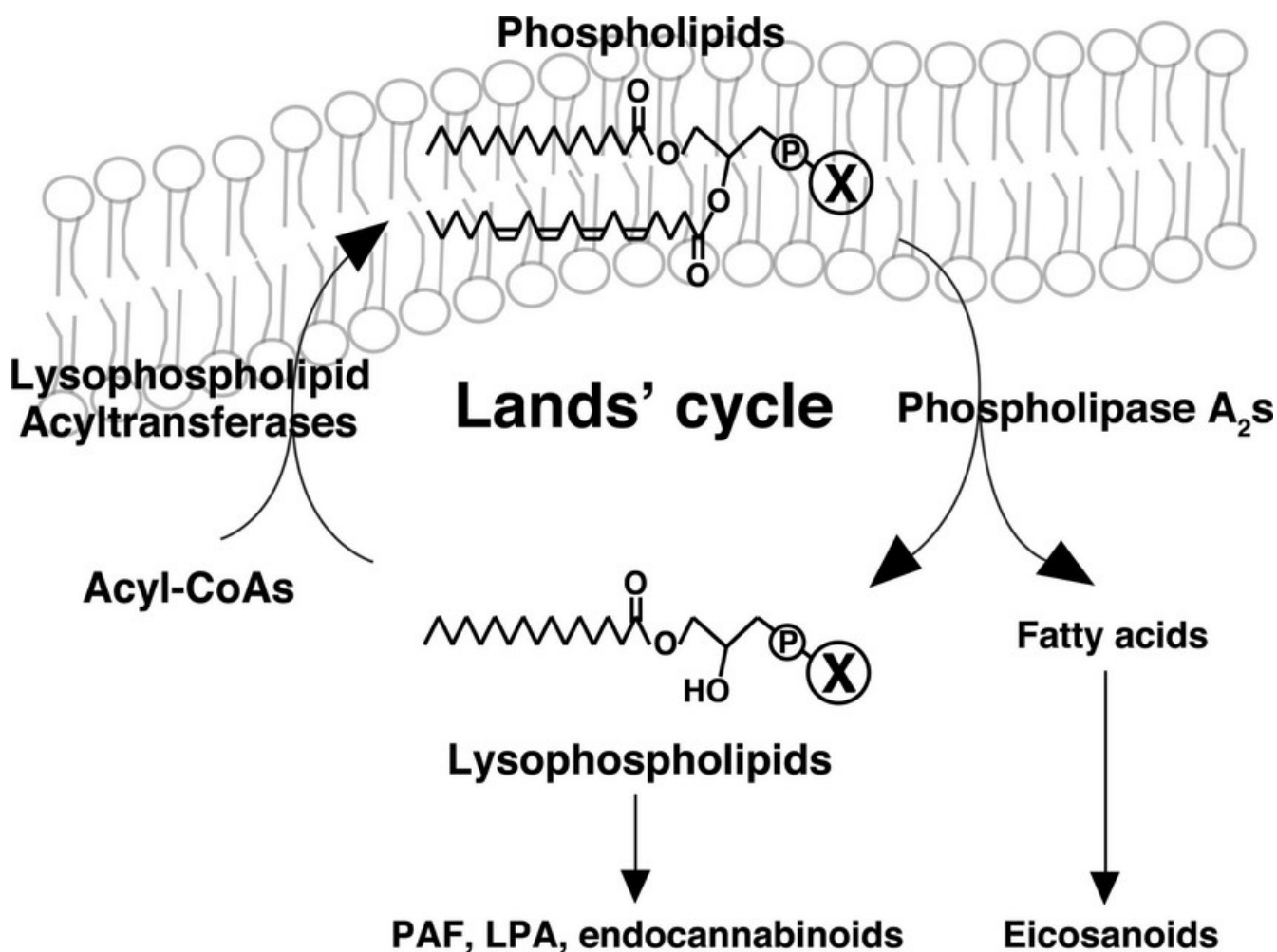


Figura 9: Ciclo de Lands esquematizado. Fonte: Hishikawa et al. (2008).

Mudanças nestes fosfolipídeos decorrentes da exposição a espécies reativas de oxigênio perturbam o ciclo, causando aumento da atividade das fosfolipases A₂, saturação e oxidação de PUFA's. Em consequência do aumento da atividade hidrolítica da cPLA₂ nos fosfolipídeos, há maior produção de PUFA's e PAF (ASHRAF; NOOKALA, 2022). Portanto, a exposição a agentes pró-oxidantes também deve causar alteração da atividade da PLA₂-Lp.

2.5. Meio ambiente e contaminantes

O crescimento da atividade industrial, falta de saneamento, explosão demográfica e os avanços tecnológicos associados ao aumento na geração de produtos químicos, como fertilizantes, inseticidas e herbicidas, têm levado a uma expansão dos compostos xenobióticos no ecossistema aquático (JESUS; CARVALHO, 2008). Muitos compostos orgânicos e substâncias tóxicas podem se acumular nos organismos vivos, por meio de

sua alocação em tecidos e órgãos, podendo ocorrer biomagnificação destas substâncias ao longo da cadeia alimentar (LE MOS; TERRA, 2003). O ambiente aquático é de fato extremamente propício à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), ao qual se soma a presença dos organofosforados e n-nitrosaminas, dentre outros compostos nocivos (ABELE; VAZQUEZ-MEDINA; ZENTENO-SAVIN, 2011; HAWKINS; STOREY, 2020), que implicam a necessidade de novas metodologias para avaliação do impacto ambiental advindo deste tipo de contaminação.

2.5.1 Nitrosaminas

As N-nitrosaminas foram classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) como compostos cancerígenos. Estes compostos podem ser gerados por vários mecanismos envolvendo um óxido de nitrogênio e aminas secundárias em vários processos químicos e até em processos fermentativos (PARK et al. 2015).

O próprio tratamento de água potável é a principal fonte de produção de nitrosaminas, que são geradas durante a última etapa de desinfecção da água para consumo, conhecida como cloraminação, onde tanto o cloro, quanto pequenas quantidades de amônia são adicionados à água, que então reagem juntos para formar cloramina, um desinfetante de longa duração. O tratamento da água com a cloroamina leva a formação NDMA (MITCH et al., 2003). Além disso, o aumento de pH eleva a formação de nitrosaminas na água, pois favorece o aumento da forma não protonada ativa das aminas, o que pode ser somado ao aumento da temperatura (KRASNER et al., 2013).

Devido a sua natureza polar, o NDMA não é bioacumulada, em contrapartida é, aparentemente, um composto de difícil biodegradação (CHARROIS; HRUDEY, 2007). Hoje em dia, as nitrosaminas, dentre elas a N-Nitrosodietilamina (NDEA) figuram entre os mais importantes contaminantes emergentes, com grande potencial para desenvolvimento de tumores em seres humanos (GUSHGARI; HALDEN, 2018). Sharma e Chadha (2021) mostraram que as nitrosaminas podem induzir várias alterações bioquímicas e genotóxicas envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio.

Resumidamente, a PLA2-Lp sérica ainda não foi avaliada quanto à sua atividade após exposição a N-nitrosaminas, ainda que estudos mostrem que, indiretamente, as nitrosaminas presentes em tabaco aumentam a expressão da PLA2 citosólica e podem relacionar-se com o aumento da hidrólise de fosfolipídeos (VIJAYARAJ et al., 2014).

2.5.2 Malathion-malaxon

Relatórios feitos em 2010/2011, mostram que o Brasil movimentou quase 1000 toneladas de agrotóxicos, correspondente a mais de 20% do gasto mundial, o que torna o nosso país o maior consumidor de agrotóxico no mundo. Quanto a isto, estima-se que cada habitante no território nacional tenha sido exposto a 4,5 litros de agrotóxico (CARNEIRO et al., 2015). Dentre os inseticidas mais utilizados na agricultura encontram-se aqueles pertencentes às classes dos organofosforados e dos carbamatos, que estão associados a efeitos danosos para saúde, alterando a função endócrina, o metabolismo, a função reprodutiva e fertilidade. *In vitro*, os organofosforados exercem ação tóxica pela intensa capacidade de inibição da acetilcolinesterase (AChE), que é uma enzima crucial no processo de recaptação e hidrólise da Acetilcolina. Além de que, no caso da forma *oxon* dos organofosforados, podem ligar-se irreversivelmente ao Citocromo P450, proteína responsável pela biotransformação de várias moléculas tóxicas que caem na circulação do organismo.

Em geral, os organofosforados podem ser caracterizados como compostos orgânicos sintéticos complexados com fósforo, o que engloba compostos como o malathion, parathion, diclorvos, dimetildiclorovinilfosfato (DDVP) e tetraetilpirofosfato (TEPP). Estes compostos são drogas que inibem a acetilcolinesterase, enzima que também regula o sistema nervoso central (MELLO et al. 2021).

No que diz respeito ao Malathion, investigações experimentais demonstraram que este composto promove peroxidação dos lipídeos de membrana, bem como aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), esgotamento de glutathione (GSH), diminuição das atividades das enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (AKBEL et al., 2018). A inibição da acetilcolinesterase ocasionada pelo malathion gera também um disparo de vias colinérgicas, atingindo os meios muscarínicos e nicóticos, havendo uma sinalização na proteína G e demais proteínas, o que acaba por afetar distintos órgãos, trazendo os resultados de parâmetros diferenciados em marcadores biológicos (PORTO et al., 2021).

A PLA2 associada a lipoproteínas, por sua vez, possui o mesmo motivo proteico da acetilcolinesterase inibida pelo malathion, o que motiva estudos sobre uma provável interação com a tríade catalítica: Serina – Histidina – Ácido aspártico. Além disto, a avaliação dos níveis séricos e atividade enzimática de fosfolipases pode vir a ser um novo parâmetro para considerações sobre toxicidade destes compostos.

3. Estudos *in silico*

3.1. Ancoragem molecular e modelagem por homologia

A ancoragem molecular (*docking*) permite identificar novos compostos para fins terapêuticos, prever interações entre alvos-ligantes a nível molecular e delinear a relação entre estruturas químicas (PINZI; RASTELLI, 2019). Esta técnica *in silico* possibilita prever os efeitos de poluentes emergentes no ambiente aquático considerando a homologia entre as enzimas de humanos e de animais (WALKER; MCELDOWNEY, 2013). Neste quesito, a modelagem por homologia é uma técnica capaz de produzir modelos tridimensionais de proteínas baseados em sequências de aminoácidos pré-existentes, adequando sua conformação através de simulações comparativas por arranjo atômico e filogenia que são baseados em índices matemáticos partidos de dados obtidos por cristalografia (SANTOS-FILHO *et al.* 2003). Assim, a semelhança de atividade enzimática e o polimorfismo genético e estrutural envolvendo a PLA2-Lp podem ser abordados através de uma análise criteriosa *in silico*.

3.2. *Danio rerio* como modelo *in silico*

Os peixes são importantes animais de laboratório em todo o mundo e têm servido como modelo na maior parte das disciplinas das ciências biomédicas. Estudos evidenciam que a quantidade de peixes utilizados como animais modelo em pesquisas e testes é substancial, quando em comparação as espécies de mamíferos de laboratório comumente usados (CASEBOLT *et al.*, 1998). Entre os vários modelos de peixes utilizados, o que mais vem sendo empregado é o *Danio rerio* (Hamilton, 1822). O peixe-zebra é um peixe teleósteo de água doce que pertence à família Cyprinidae, nativo do sul e sudeste asiático, regiões que apresentam clima tropical. Caracteriza-se por ser um modelo animal de destaque em pesquisas científicas, em todas as fases de desenvolvimento, usado para estudos sobre o potencial farmacológico de novas drogas e na toxicologia de contaminantes ambientais, embriologia, biologia do comportamento, entre outras (TANGUAY, 2018; CHOI *et al.*, 2021).

Mesmo assim, ainda não possui modelo cristalizado de sua PLA2-Lp na plataforma PDB (Protein Data Bank – <https://www.rcsb.org>). A modelagem por homologia desta enzima, portanto, deve permitir melhor direcionamento para estudos futuros na área da saúde e toxicologia.

4. Testes *in vitro*

4.1. Camundongos suíços para testes *in vitro*

Os camundongos suíços (*Mus musculus*) são bastante adequados para testes bioquímicos, pois têm ciclo de vida curto e possuem semelhanças fisiológicas e genéticas com o corpo humano bastante evidentes (HARKNESS; WAGNER, 1993). Neste projeto, camundongos foram usados para garantir o material biológico ideal (plasma) para uma melhor avaliação enzimática da PLA2-Lp *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Construir um modelo estrutural da PAF-AH de *Danio rerio* que permita inferências empíricas sobre os efeitos das nitrosaminas e malathion sobre a atividade da PAF-AH plasmática de vertebrados a partir de metodologias computacionais associadas à bancada.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Modelar a PLA2-Lp de *Danio rerio* através de homologia molecular com base em modelo cristalográfico de PLA2-Lp humana e realizar adequação tridimensional *in silico* correspondente.
2. Executar *docking molecular* para avaliar complexos entre PLA2-Lp humana e os substratos: NOBA (3-Nitrosobenzamida), malathion, N-Nitrosodietilamina, N-Nitrosodimetilamina e o inibidor sintético (darapladib).
3. Testar a enzima advinda de plasma de camundongos (*Mus musculus*) acondicionadas com nitrosaminas e malathion frente ao NOBA e verificar o impacto obtido na atividade enzimática da PLA2-Lp.

6. CRONOGRAMA

Este trabalho foi subsidiado pelo laboratório de bioquímica e peptídeos (BIOMOLPEP) do Instituto de Biociências do Litoral Paulista (UNESP-CLP) e está atrelado ao programa de estágio de um ano, com vigência de bolsa de iniciação científica financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob o protocolo (6473 - 4/2022 – PIBIC).

Tabela 1. Cronograma de atividades realizadas durante a vigência da bolsa de iniciação científica.

<i>Atividades/meses</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
<i>Molecular docking</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>		<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	
<i>Modelagem por homologia PLA2-Lp (Danio rerio)</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>							
<i>Caracterização enzimática in vitro</i>									<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	
<i>Análise bioquímica de PLA2-Lp (Mus musculus)</i>							<i>X</i>	<i>X</i>				
<i>Manutenção e monitoramento dos animais em viveiro.</i>							<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	
<i>Revisão da literatura</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>		<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	<i>X</i>	
<i>Relatórios</i>						<i>X</i>						<i>X</i>

7.MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. *Mus musculus*

Foram utilizados 5 camundongos suíços fêmeas (~30 g, n = 5) obtidos no Centro Multidisciplinar de Pesquisa Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram alojados em gaiolas sob condições ambientais controladas: temperatura constante a 25°C, ciclo claro/escuro de 12 h, com alimento e água disponíveis *ad libitum*. O experimento *in vivo* foi realizado de acordo com as regras institucionais do comitê de ética da UNESP, ao qual o projeto fora submetido.

7.2. Coleta de sangue e eutanásia

A amostra de sangue foi coletada por punção da artéria caudal, usando um escalpe de 27 g. O material obtido foi armazenado em tubos de coleta com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, tubo EDTA BD Vacutainer) e centrifugado para separar o plasma, que foi refrigerado antes de ser destinado às análises bioquímicas.

Após a coleta de sangue, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ como alternativa indolor de rápida execução em casos de pequenos roedores. O procedimento foi feito de acordo com as diretrizes de eutanásia da Comissão de Ética no Uso de Animais vigentes da instituição (CONCEA) em substituição aos métodos recomendáveis que utilizam anestésicos, uma vez que a avaliação dos materiais biológicos *post mortem* é sensível à administração destas substâncias, que podem comprometer os resultados. O procedimento foi feito em câmara vedada e de fluxo controlado para que o animal entrasse em narcose antes da parada cardio – respiratória.

7.3. Monitoramento Enzimático – Colorimétrico para PAF AH em plasma

Adaptandamos a metodologia descrita por Petrovic et al. (2001) para o ensaio enzimático. Para isto, preparamos 50 ml de solução tampão a 2,8 g/l de Tris HCL, 0,1 g/l de KCL e 0,5 g/l NH₄OH garantindo pH de 7,6 para os testes. A alternativa de tampão desenvolvida foi feita a fim de não permitir a interação com Cálcio iônico externo, formando assim, um ensaio que pudesse diferenciar a atividade da PAF-AH plasmática (cálcio-independente) das demais PLA2.

Para monitorar a atividade enzimática da PAF-AH preparamos uma solução de NOBA (3-Nitrosobenzamida) como substrato cromogênico convencional para PLA2 na concentração de 10mM em água deionizada. A preparação desta solução passou por um ciclo de vortex (5 min) – banho ultrassônico (20 min) – vortex (2 min), que foi capaz de homogeneizar a mistura. A solução substrato foi utilizada imediatamente após a preparação, evitando ao máximo a degradação natural do NOBA.

A análise dos poços foi feita em espectrofotômetro utilizando os comprimentos de onda de 425 e 600 nanômetros lidos pela máquina a cada 5 minutos por 85 minutos (18 leituras). Na mesma placa de 96 poços constaram (cada qual em triplicata): uma solução controle (n = 3), quatro soluções branco (n = 12), e quatro diferentes tratamentos. Os tratamentos consistiram em duas soluções que continham N - nitrosodietilamina a 720 µl/l e a 1,44 ml/l (n = 6) e outras duas soluções contendo Dimethyson a 100 µg/l e a 15 mg/l (n = 6). No total foram utilizados 27 poços com diferentes proporções de volume por solução, sendo que cada poço totalizou 250 µl.

Para eliminar os erros de turbidez no cálculo de atividade enzimática de PLA2 em função da absorbância obtida (*Optical density* - OD) foi aplicada a seguinte fórmula (PETROVIC et al., 2001) com fator de correção ajustado para nossas medições:

$$\text{Atividade de PLA2 } [\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 0,25 \text{ ml}^{-1}] = (\text{OD}_{425\text{nm}} / \text{h} - \text{OD}_{600\text{nm}} / \text{h}) \times 0,098275 [\mu\text{mol} / \text{OD}_{425\text{nm}}] \times (1 / 0,25 \text{ ml})$$

O fator de correção (0,098275) representa a concentração estimada de produto colorimétrico (µmols em 250 µl) gerado a partir da degradação do NOBA capaz de produzir uma absorbância de 1.0 (OD) a 425 nm.

7.4. Tratamento dos dados e análise estatísticas

A fim de reduzir erros de leitura de absorbância, em função da turbidez e degradação natural do substrato NOBA, foi subtraído de cada rodada (18 leituras) o valor correspondente à primeira leitura de atividade enzimática de cada poço. Da mesma maneira, de cada média obtida para os diferentes tipos de tratamento foram subtraídos os valores de brancos respectivos em cada leitura.

Para a produção dos dados gráficos de atividade enzimática utilizamos o software Prism 8.0.2 e para as análises estatísticas utilizamos software RStudio (2020). *Outliers* foram excluídos da análise.

7.5. Modelagem molecular e *docking*

O estudo parte da determinação da sequência de aminoácidos integral da PLA2-Lp humana, depositadas nas bases de dados PDB (Protein Data Bank - <https://www.rcsb.org>) e no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Esta sequência (molde), então, foi alinhada à sequência da PAF-AH de *Danio rerio* (alvo), a partir de banco de dados genéticos e de proteína associado ao UniProt (<https://www.uniprot.org>) e com auxílio do algoritmo BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A proteína de *Danio rerio* foi editada com a remoção artificial dos resíduos intermediários: 203 a 216; 193; 194 e 157 que não possuíam correspondência com a estrutura humana alvo (gap de 20 resíduos). A porção correspondente ao N - terminal da proteína de *Danio rerio* (posição 1 a 9) também foi excluída da modelagem. Supõe-se que o truncamento não foi relevante para sua estrutura ou função, considerando que os resíduos excluídos estavam muito distantes das principais estruturas terciárias e sítio catalítico. O refino das sequências foi garantido pelo software de alinhamento sequencial múltiplo Jalview (WATERHOUSE et al., 2009). Os modelos tiveram sua validação documentada em gráfico de Ramachandran através do site Molprobitry da universidade de medicina de Duke (<http://molprobitry.biochem.duke.edu/>). Utilizamos a plataforma SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) e o programa Chimera 1.14 (Ucsf Chimera, 2004) para a montagem de um modelo molecular estrutural da proteína finalizado em formato PDB (Figura 11).

O *docking* molecular foi utilizado para avaliar o potencial interação de xenobióticos sobre a PLA2-Lp. As simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas pela plataforma SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>) e Autodock Vina (SEELIGER; DE

GROOT, 2010). Utilizamos o site PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), que pertence ao banco de dados do NCBI, para acessar as moléculas ligantes e avaliamos suas estruturas através dos programas Molinspiration (Molinspiration Cheminformatics, 2005) em termos de semelhanças estruturais e propriedades moleculares.

As figuras resultantes desses estudos foram construídas pelos programas: PYMOL v2.4 (SEELIGER; DE GROOT, 2010), Chimera 1.14 (Ucsf Chimera, 2004), Modeller 10.1 (Modeller, 2021) e LigPlot⁺ 2.2. A plataforma Molinspiration (Molinspiration Cheminformatics, 2005) também foi utilizada para melhor visualização da estrutura dos compostos, bem como o software Discovery Studio 4.0 (Biovia Foundation, 2007).

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O papel das fosfolipases no metabolismo lipídico e no controle de doenças concentrou a atenção de pesquisadores das mais variadas áreas nas últimas décadas. Estes estudos têm provado cada vez mais o caráter pivotal da classe VII dessas enzimas nestes processos, principalmente da PLA2-Lp ou PAF-AH, que se tornou expoente em análises epidemiológicas e farmacológicas como mostra a revisão de Huang, Wang e Shen (2019).

Existem detalhamentos moleculares e genéticos bastante relevantes desta enzima, embora o banco de dados ainda precise ser atualizado com informações mais recentes sobre seu polimorfismo (HUANG et al., 2014).

Para isto, construímos uma árvore filogenética por vizinhança sequencial da PAF-AH de diversos organismos, incluindo o homem, zebrafish, camundongo e animais de linhagens próximas, como outros primatas, roedores e osteíctes (Figura 10).

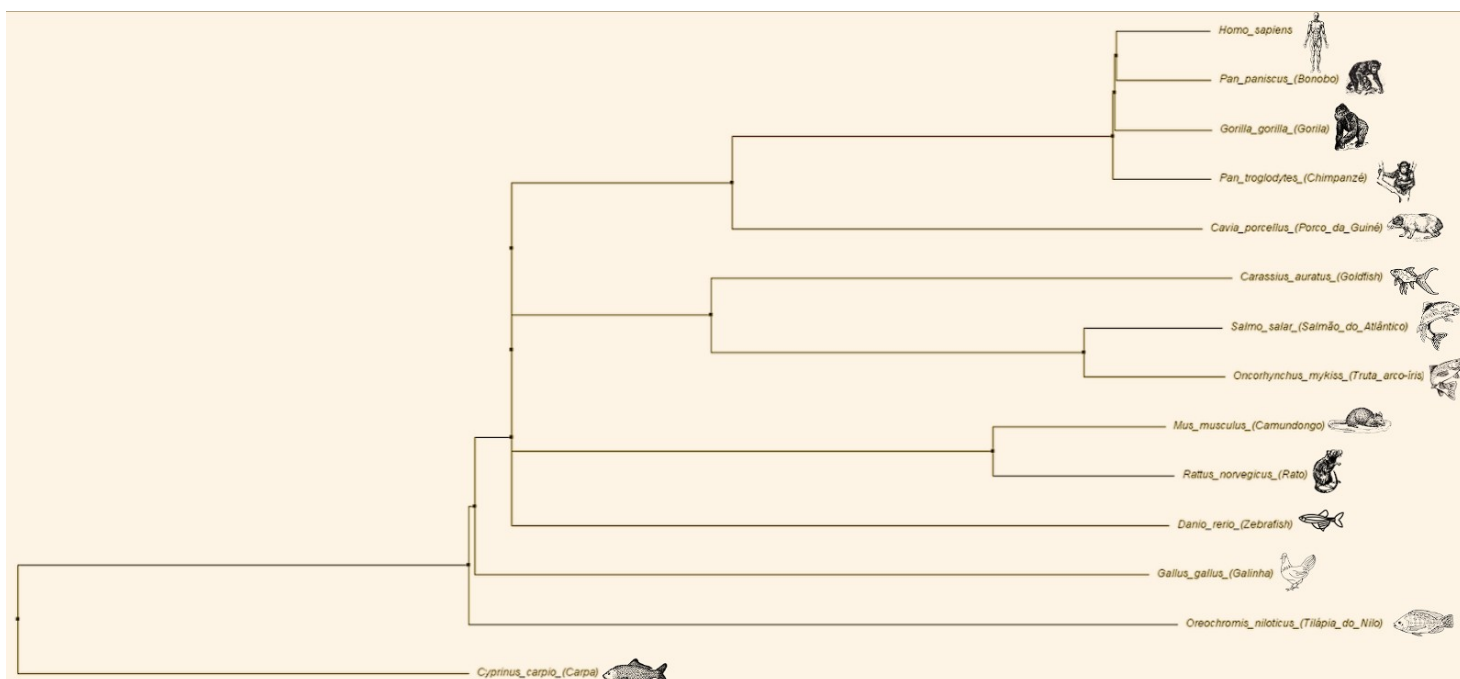


Figura 10. Proximidade entre organismos referente à homologia da estrutura primária das respectivas enzimas (PAF-AH).

A PLA2-Lp segundo a literatura faz parte de uma rede de interações bastante ampla e seu caráter bioquímico singular impede uma abordagem simplista, ou estritamente clínica. Esta visão pode ser reiterada quando numerosos ensaios e testes *in vivo* tentaram reproduzir resultados obtidos em análises laboratoriais sem muito sucesso (HUANG, WANG e SHEN, 2019).

Atualmente acredita-se que a atividade enzimática da PLA2-Lp deva ser compreendida através de dois aspectos, talvez igualmente relevantes: a interface das lipoproteínas com o substrato e o sítio catalítico da enzima. Uma vez que a PLA2-Lp é reconhecida majoritariamente em complexos com HDL e LDL e os níveis de colesterol e a qualidade do perfil lipídico do organismo estudado também são definitivos para a sua compreensão (STAFFORINI, 2008).

A fim de investigar estas propriedades de acordo com a estrutura da enzima produzimos também um modelo estrutural da PAF-AH plasmática de *Danio rerio* com modelagem por homologia que foi bastante consistente com as principais métricas utilizadas na área (GA341 = 1,00 e zDOPE = -1,60) e que refletiram em valores ideais para torções angulares dos resíduos de aminoácidos (Psi e Phi). Sendo que 97% deles ocuparam regiões favoráveis no gráfico de Ramachandran (Gráfico 1). A estrutura

truncada da PAF-AH de *Danio rerio* (372aa) e seus resíduos mais importantes podem ser observados em *licorice* e *cartoon* no programa Pymol (figura 11).

Complementarmente, o sítio ativo da PAF-AH de *Danio rerio* aparece sobreposto pelo sítio ativo da proteína humana molde, representando uma correspondência quase perfeita (RMSD = 0.061) e identidade de 100% (Figura 12). Estas informações são essenciais para distinguir resíduos consensuais (em **negrito**) quando comparamos a estrutura obtida com o cristal da PAF-AH humana.

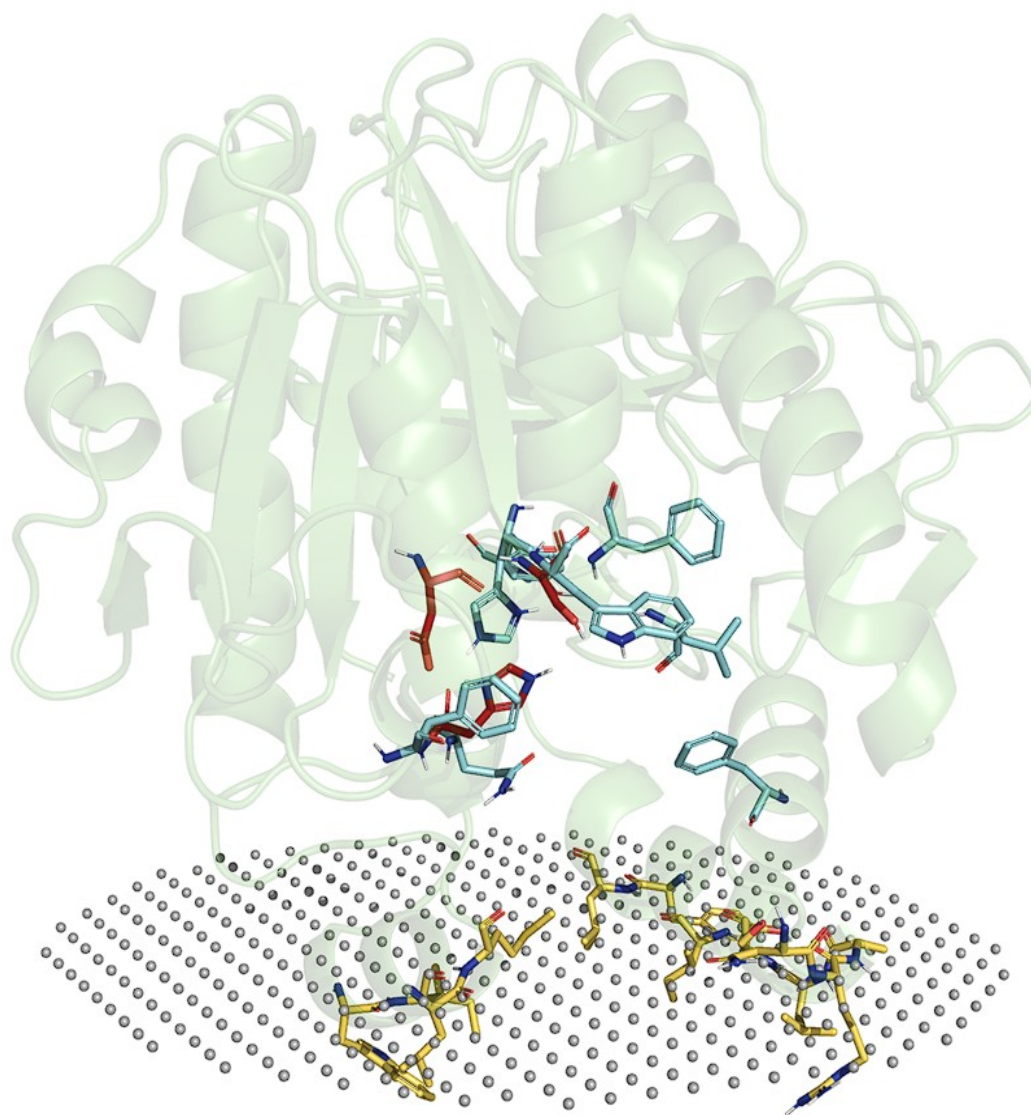


Figura 11. Orientação da PAF-AH de *Danio rerio* em membrana. Triade catalítica (vermelho) – **Ser216; Asp239; His94** - Resto do sítio ativo (ciano) – **Phe55; Leu98; Tyr105; His215; Phe217; Trp241; Phe265; Gln295** - Interface membrana (amarelo) – **Asn58; Arg59; Ala60; Leu61; Ser62; Ile65; Tyr68; Leu69; Trp307; Ile308; Leu 311; Met312**. Resíduos em consenso com a PAF-AH humana foram aqui destacados em **negrito**.

Figura 12. PAF-AH *Danio rerio* e seus principais resíduos (azul) sobrepostos aos resíduos nomeados da PAF-AH humana (amarelo) correspondentes.

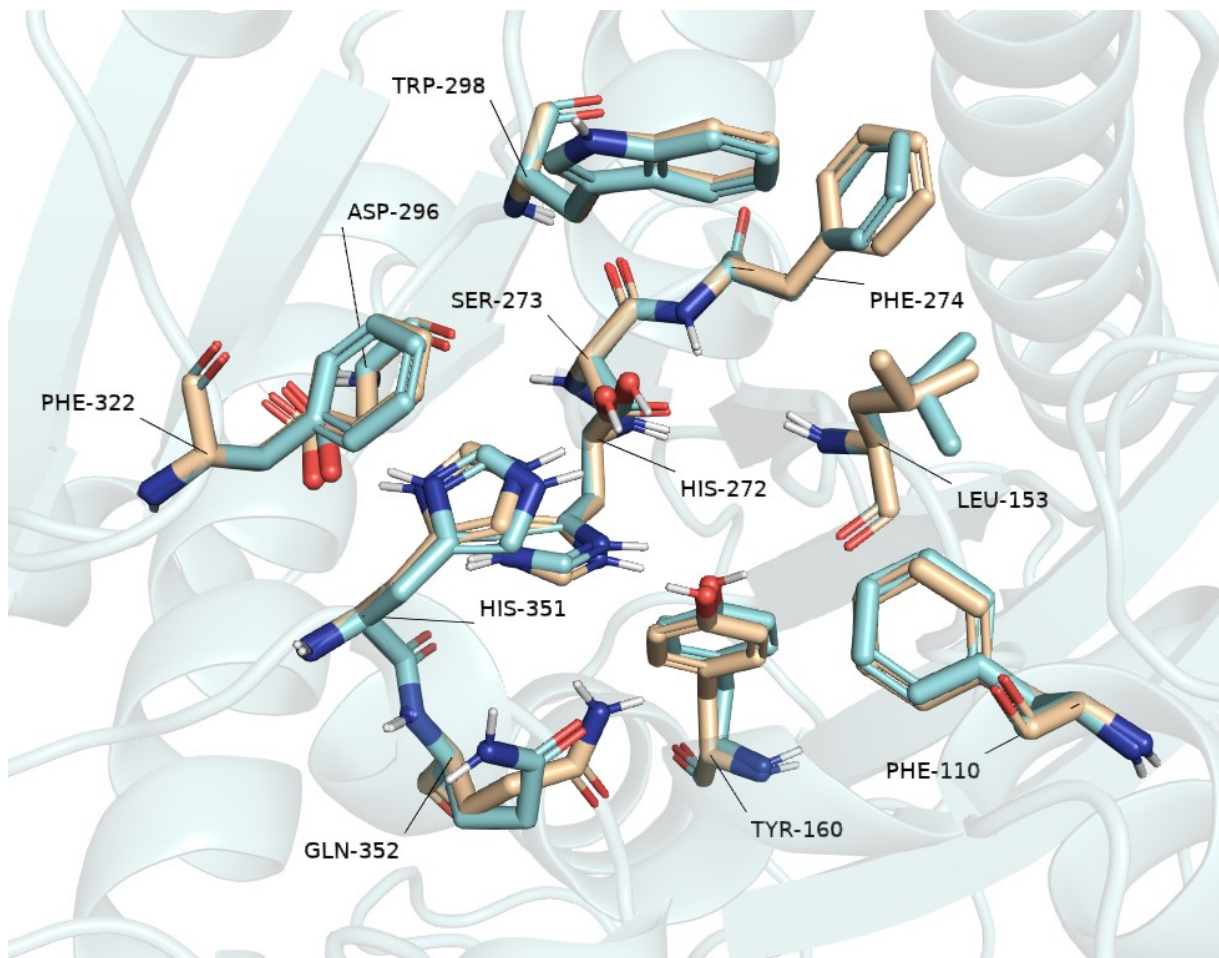
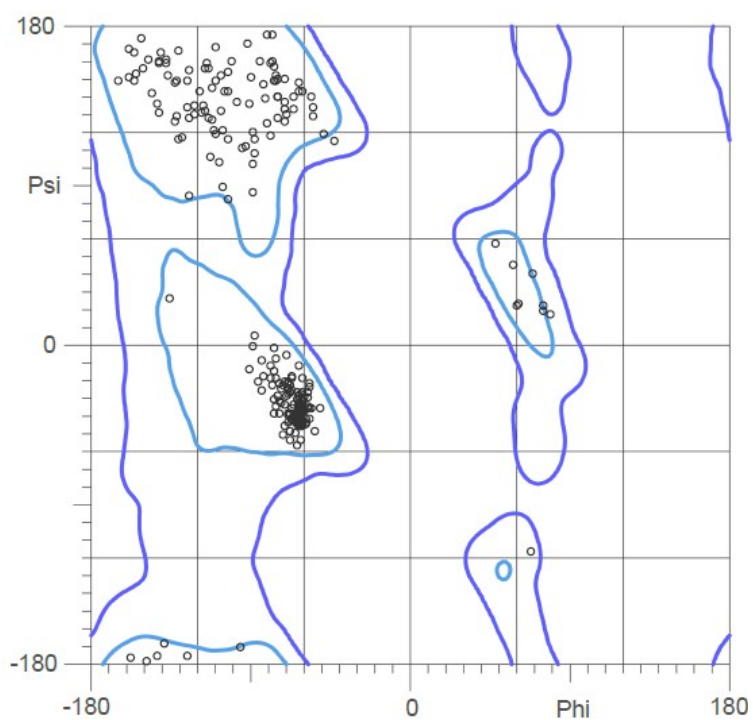


Gráfico 1. Ramachandran geral para PAF-AH de *Danio rerio*.



Em se tratando dos compostos interativos com a PAF-AH foram desenvolvidos diversos fármacos na tentativa de criar mecanismos de inibição da PLA2-Lp e o sucesso destes principais compostos é questionável (CAMPOS et al., 2014). Ainda há bastante oportunidade para a descoberta de drogas, naturais ou não, que sejam capazes de conferir reais soluções aos mais variáveis distúrbios inflamatórios, imunológicos e cardiovasculares associados à enzima, mesmo que este objetivo exija a incorporação de novos métodos, como a modelagem *in silico* (WALKER et al, 2013).

Não obstante, a PLA2-Lp é uma enzima bastante sensível a interferências exógenas e ao equilíbrio natural do organismo, deixando clara a relação entre o perfil lipídico dos animais, estresse oxidativo, nutrição e sua atividade metabólica. Assim, compreende-se que estas características devem ser exploradas em função de suas interações com xenobióticos diversos de interesse para a ecotoxicologia (MITCH et al., 2003; MELLO et al., 2021), para qual o zebrafish é um modelo experimental de renome (CHOI et al., 2021).

Nesta direção os nossos estudos *in silico* mostram interações consistentes entre dois xenobióticos investigados (NDEA e malathion) e o sítio ativo da PAF-AH humana, com evidências teóricas de que são capazes de comprometer sua atividade (Figura 13 e 14).

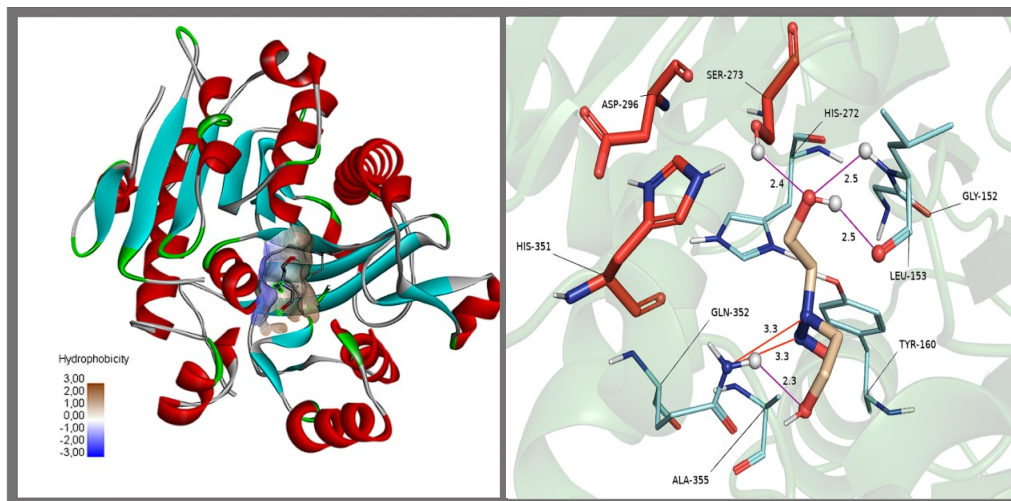


Figura 13. Melhor posição para NDEA. Diagrama de hidrofobicidade (esquerda) e detalhes das interações com NDEA (direita). Linhas vermelhas representam ligações desfavoráveis e roxas pontes de hidrogênio.

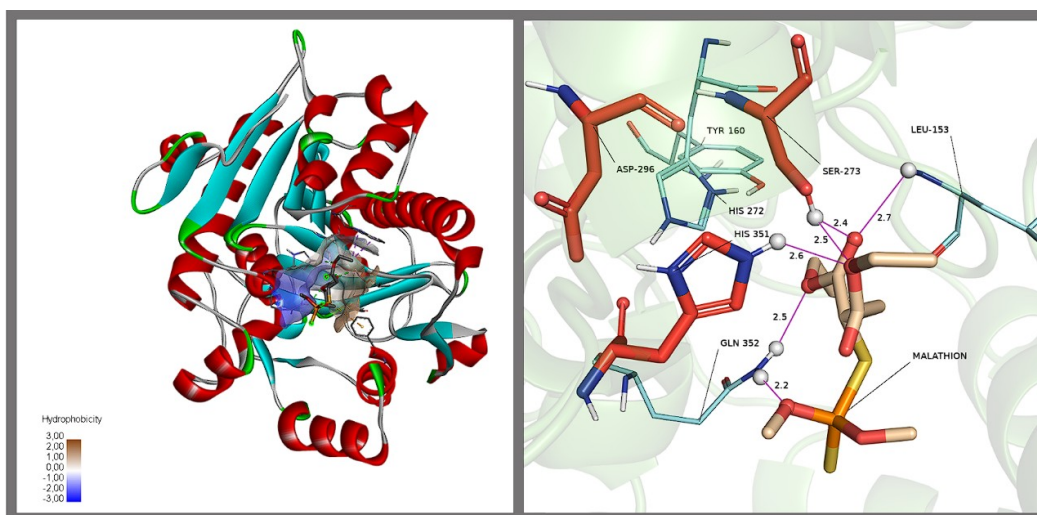


Figura 14. Melhor posição para malathion. Diagrama de hidrofobicidade (esquerda) e detalhes das interações com malathion (direita). Linhas vermelhas representam ligações desfavoráveis e roxas pontes de hidrogênio.

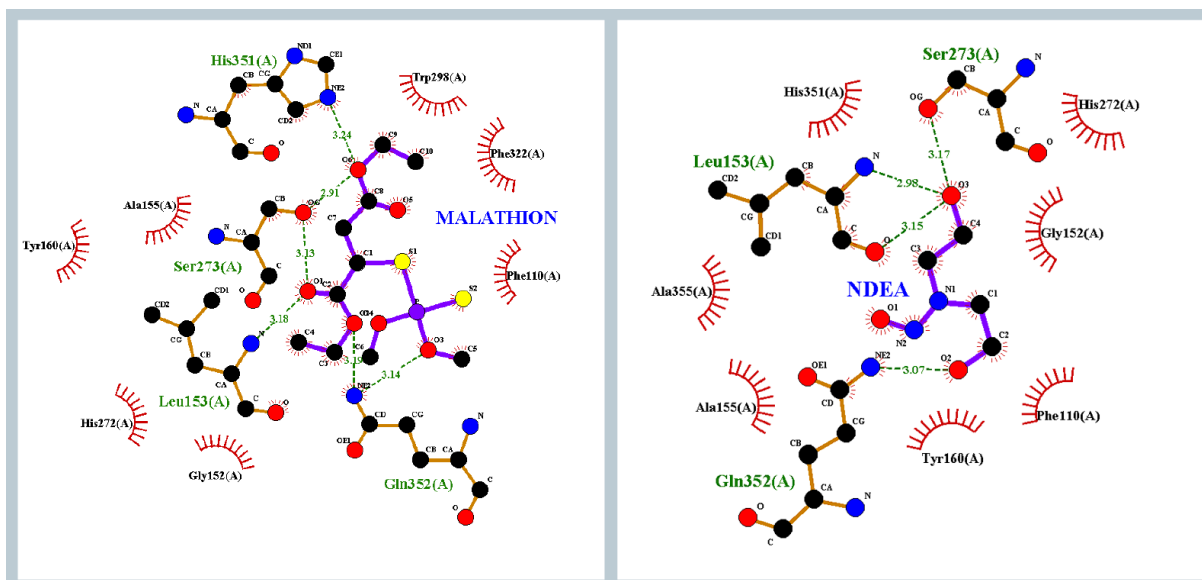


Figura 15. Diagrama LigPlot⁺ dos xenobióticos com a PAF-AH humana. Detalhes das interações com malathion (esquerda) e NDEA (direita). Os compostos foram representados em roxo, os resíduos com pontes de hidrogênio (verde pontilhado) em marrom e as interações hidrofóbicas são representadas pelas coroas vermelhas.

É possível notar que a conformação estrutural de ligação do composto malathion é bastante condizente com a observada em cristais da proteína em ligação com outros organofosforados bioativos, como o Paraoxon. Assim, nossos resultados aproximam-se da ligação covalente por intermediário tetraédrico teorizada por Samanta e Bahnson (2008), onde o oxigênio da cadeia lateral da serina catalítica é responsável pelo ataque nucleofílico (Figura 15). Portanto, é possível que, embora os resultados *in silico* aqui dispostos se restrinjam a interações intermoleculares, a qualidade da ligação observada com o malathion seja de fato covalente.

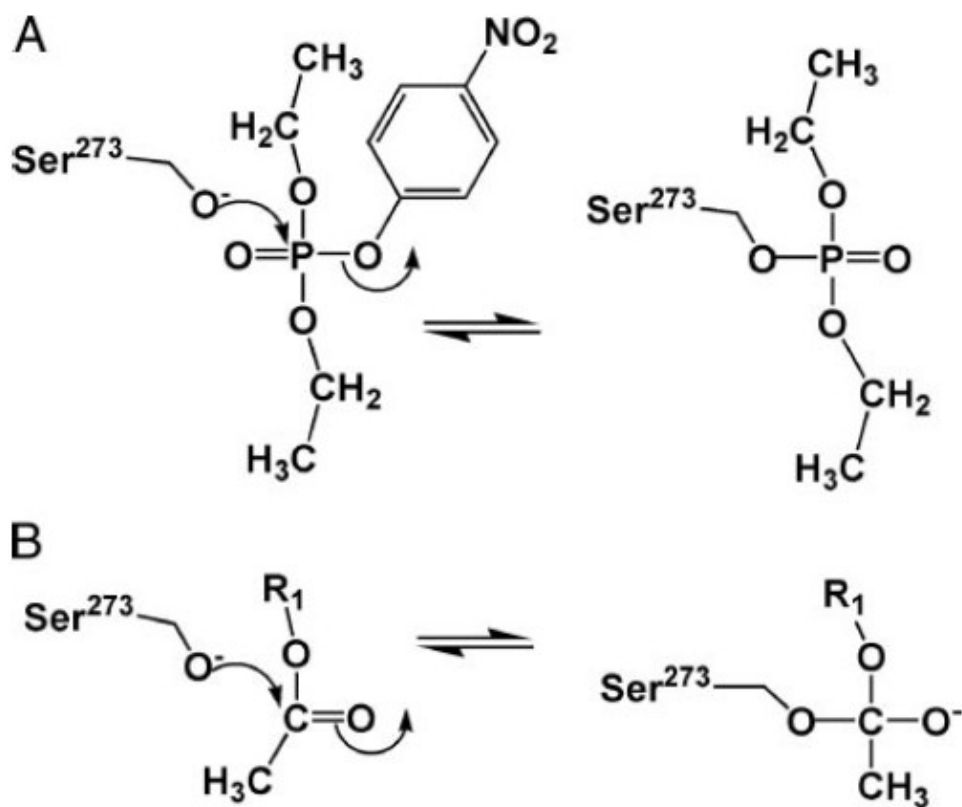


Figura 16. A: reação da SER-273 da PAF-AH humana com Paraoxon. B: primeiro passo da reação de hidrólise de éster por ataque nucleofílico da SER-273 ao substrato natural, onde R₁ representa o liso-PAF. Há uma mimetização do intermediário tetraédrico da reação original. Fonte: Samanta e Bahnson (2008).

Adicionalmente, as interações obtidas com os compostos analisados foram comparadas às interações entre o substrato natural (NOBA) e inibidor sintético (Darapladib) e foram dispostas (Tabela 2). Os xenobióticos NDEA e malathion apresentaram compatibilidade com o sítio ativo da proteína, ainda que com energia livre de ligação alta em comparação ao substrato natural. O composto NDMA não apresentou interação consistente.

Tabela 2. Sumário das interações entre ligantes testados e PAF-AH humana.

Docking	Monômero Lp-PLA2 Humana / Cadeia A		
Substratos ->	MALATHION	NDMA	NDEA
Ligações com Asp 296	0	0	0
Ligações de hidrogênio com Asp 296	NA	NA	NA
Distância de Ligações com Asp 296	NA	NA	NA
Ligações com His 351	6	0	2
Ligações de hidrogênio com His 351	1	0	NA
Distância de Ligações com His 351	3,13	NA	3,3
Ligações com Ser 273	9	0	4
Ligações de hidrogênio com Ser 273	2	0	1
Distância de Ligações com Ser 273	2,99	NA	2,9
Número de ligações com sítio ativo	> 37	1	> 42
Distância das ligações com sítio ativo	3,07	3,4	2,98
Conformidade ao perfil Hidrofílico de superfície	Compatível	Incompatível*	Compatível
Total de ligações de hidrogênio com sítio ativo	6	0	4
Ligações desfavoráveis totais	0	2	2
Ligações totais até 3,5 Å	33	15	41
Energia livre da ligação	-4,9 kcal/mol	-3,2 kcal/mol	-4,3 kcal/mol
Observações	*Alta energia livre	*Molécula longe do sítio	*Alta energia livre

Tabela 3. Sumário das interações entre os principais substratos e PAF-AH humana.

Docking	Monômero Lp-PLA2 Humana / Cadeia A	
Substratos ->	NOBA	Darapladib
Ligações com Asp 296	0	0
Ligações de hidrogênio com Asp 296	NA	NA
Distância de Ligações com Asp 296	NA	NA
Ligações com His 351	5	7
Ligações de hidrogênio com His 351	1	0
Distância de Ligações com His 351	3,16	3,13
Ligações com Ser 273	5	12
Ligações de hidrogênio com Ser 273	1	1
Distância de Ligações com Ser 273	2,9	2,9
Número de ligações com sítio ativo	> 40	>49
Distância das ligações com sítio ativo	2,98	3,06
Conformidade ao perfil Hidrofílico de superfície	Compatível	Compatível
Total de ligações de hidrogênio com sítio ativo	4	1-4
Ligações desfavoráveis totais	0	0
Ligações totais até 3,5 Å	42	76
Energia livre da ligação	-6,7 kcal/mol	NA
Observações	*Estabilização Ser/His	*Estabilização Ser/His

Já o teste *in vitro*, foi capaz de evidenciar a interferência de inibição da PAF-AH pelo malathion quando em maior concentração 15 mg/l, mas não reproduziu o mesmo efeito nos demais tratamentos (Gráfico 2).

Todos os dados de absorvância (OD) em função do tempo foram considerados não paramétricos segundo teste de homoscedasticidade (Levene) e normalidade (Shapiro-Wilk) e foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis para atividade enzimática em proporção à média de atividade máxima atingida no controle. Obtivemos diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Gráfico 2. Atividade enzimática. Valores das médias dos tratamentos em proporção à máxima atividade atingida pelo controle (100%).

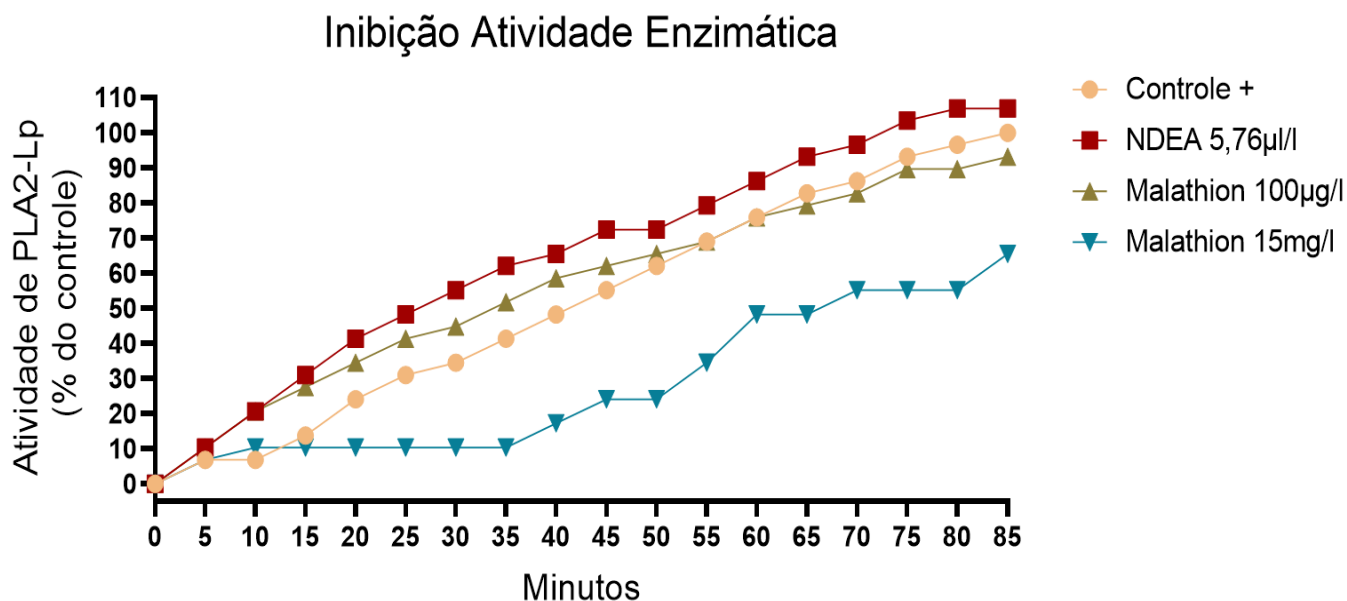
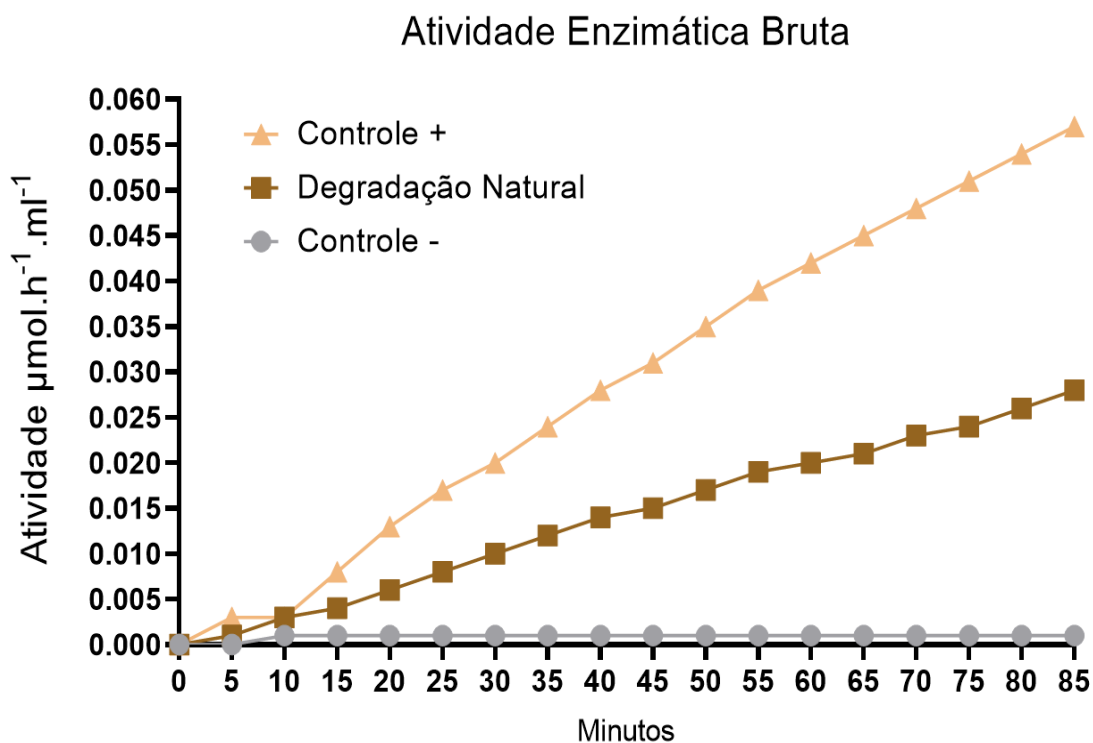


Gráfico 3. Atividade enzimática bruta em μmol de produto colorimétrico.



Os valores referentes à atividade enzimática dos tratamentos demonstrados resultam da diferença entre a atividade observada bruta e as médias da formação de

produtos colorimétricos dos compostos em meio aquoso e sem amostra de sangue (respectivos brancos).

Os valores referentes à atividade enzimática do tratamento com malathion a 15mg/l foram corrigidos por conta da interferência causada pela opacidade causada pelo composto diluído. Salina corresponde ao controle positivo e o controle negativo

O tratamento com NDEA na concentração de 720 µl/l foi excluído dos resultados, pois sofreu interferência (formação de bolhas), o que comprometeu o ensaio enzimático.

9. CONCLUSÃO

Compreender a funcionalidade da PLA2-Lp como um todo deve conferir bases para avanços no tratamento e prevenção de doenças, como Alzheimer, aterosclerose e cânceres, ao mesmo tempo que cria espaço para aprimoramentos em técnicas de manejo e de preservação ambiental.

Esta complexidade, poderá ser adequadamente contemplada com experimentos futuros mais robustos que levem em consideração não só a flutuação da PLA2-Lp, frequentemente associada à flutuação de LDL, mas principalmente a relação de interação entre muitos outros substratos naturais e sintéticos, desde que em face a uma análise sistemática de detalhamento por lipidômica e imunologia.

Neste quesito, é essencial estender a aplicabilidade dos testes científicos para uma gama de organismos usados em laboratório com a finalidade de reduzir custos e gerar resultados em menor prazo.

A análise bibliográfica, bem como os estudos complementares realizados neste trabalho foram feitos na direção de esclarecer o leitor acerca da estrutura e função da enzima PAF-AH plasmática, a partir da constatação da homologia estrutural teórica entre a PAF-AH de *Danio rerio* e a PAF-AH humana. Os resultados apresentados permitem deduzir que os compostos aqui testados são capazes de interagir com a PAF-AH de diversos organismos, sendo mamíferos ou peixes, como demonstra o *docking molecular* realizado na proteína modelo (PAF-AH humana).

O ensaio enzimático no entanto, corroborou com as predições teóricas apenas no caso do tratamento com malathion a 15mg/l, em que a curva de atividade enzimática da PAF-AH em plasma comportou-se de forma a refletir possivelmente efeitos de inibição por competição de substratos.

No entanto, a possibilidade de incorrer ao erro do tipo II (falso negativo) para os outros tratamentos não pode ser descartada, uma vez que as outras concentrações utilizadas nos testes foram relativamente baixas.

A concentração testada, no caso da NDEA é cerca de oito e quatro vezes menor do que a utilizada em injeção intraperitoneal para efeitos tóxicos agudos em roedores (0,2 mg/kg), enquanto que as concentrações testadas de malathion representam respectivamente a concentração máxima (100 µg/l) permitida em águas pouco poluídas (classe III) pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a indicada para uso doméstico segundo fabricante do Dimethyson (15mg/l).

Portanto, conclui-se que novas evidências capazes de estabelecer relações entre os xenobióticos (e fármacos) e a PAF-AH devem ser direcionadas por ensaios com exposição crônica, a fim de replicar de maneira mais aproximada os efeitos de biomagnificação destas substâncias nas cadeias tróficas, bem como a complexidade e implicações da manutenção dos níveis e atividade de PAF-AH plasmática nos organismos em diferentes momentos metabólicos e frente a estresse oxidativo.

10. BIBLIOGRAFIA

ABELE, Doris; VAZQUEZ-MEDINA, Jose Pablo; ZENTENO-SAVIN, Tania (ed.).

Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. [S.L.]: Wiley-Blackwell, 2011. 548 p.

ADEBIYI, Morayo G.; MANALO, Jeanne M.; XIA, Yang. **Metabolomic and molecular insights into sickle cell disease and innovative therapies.** Blood Advances, [S.L.], v. 3, n. 8, p. 1347-1355, 23 abr. 2019. American Society of Hematology.<http://dx.doi.org/10.1182/bloodadvances.2018030619>.

AKBEL, Erten et al. **The subchronic exposure to malathion, an organophosphate pesticide, causes lipid peroxidation, oxidative stress, and tissue damage in rats: the protective role of resveratrol.** Toxicology Research, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 503-512, 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1039/c8tx00030a>.

ANDROULAKIS, Nicolaos et al. **Molecular and mechanistic characterization of platelet-activating factor-like bioactivity produced upon LDL oxidation.** Journal Of Lipid Research, [S.L.], v. 46, n. 9, p. 1923-1932, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m500074-jlr200>.

ASHRAF, Muhammad A., NOOKALA, Vinod. **Biochemistry of Platelet Activating Factor**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

Blanchet, Carole et al. **Fatty acid composition of wild and farmed atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Lipids*, 2005, 40, 529-531.

CAMPOS, Carlos M et al. **Darapladib for the treatment of cardiovascular disease**. *Expert Review Of Cardiovascular Therapy*, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 33-48, 18 dez. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/14779072.2015.986466>.

CAO, Jian et al. **Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Interacts with Phospholipid Vesicles via a Surface-Disposed Hydrophobic α -Helix**. *Biochemistry*, [S.L.], v. 50, n. 23, p. 5314-5321, 17 maio 2011. American Chemical Society(ACS).<http://dx.doi.org/10.1021/bi101916w>.

CAO, Yang et al. **Expression of Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase Is Transcriptionally Regulated by Mediators of Inflammation**. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 273, n. 7, p. 4012-4020, fev. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.7.4012>.

CARNEIRO, Fernando F. et al. (Org.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARPENTER, Keri L.H.; DENNIS, Ian F.; CHALLIS, Iain R.; OSBORN, David P.; MACPHEE, Colin H.; LEAKE, David S.; ARENDS, Mark J.; MITCHINSON, Malcolm J. **Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 diminishes the death-inducing effects of oxidised LDL on human monocyte-macrophages**. *Febs Letters*, [S.L.], v. 505, n. 3, p. 357-363, 21 set. 2001. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02840-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02840-x).

CASEBOLT et al. **Care and Use of Fish as Laboratory Animals: Current State of Knowledge**. *Comparative Medicine* [S.L.], v. 48, n. 2, p. 124-136, 1998.

CHARROIS, Jeffrey W.A.; HRUDEY, Steve E.. **Breakpoint chlorination and free-chlorine contact time: implications for drinking water n-nitrosodimethylamine concentrations**. *Water Research*, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 674-682, fev. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.031>

CHOI, Tae-Young; CHOI, Tae-Ik; LEE, Yu-Ri; CHOE, Seong-Kyu; KIM, Cheol-Hee. **Zebrafish as an animal model for biomedical research**. *Experimental & Molecular Medicine*, [S.L.], v. 53, n. 3, p. 310-317, mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-021-00571-5>.

DIMITRIOU, Polytimi S.; DENESYUK, Alexander; TAKAHASHI, Seiji; YAMASHITA, Satoshi; JOHNSON, Mark S.; NAKAYAMA, Toru; DENESSIOUK, Konstantin. **Alpha/beta-hydrolases: a unique structural motif coordinates catalytic acid residue in 40 protein fold families**. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, [S.L.], v. 85, n. 10, p. 1845-1855, 3 jul. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.25338>.

EMSLEY, Paul; COWTAN, Kevin. **Coot: model-building tools for molecular graphics**. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, [S.L.], v. 60, n. 12, p. 2126-2132, 26 nov. 2004. International Union of Crystallography (IUCr). <http://dx.doi.org/10.1107/s0907444904019158>.

GARZA, Carolina A. et al. **Association Between Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Cardiovascular Disease: a systematic review**. *Mayo Clinic Proceedings*, [S.L.], v. 82, n. 2, p. 159-165, fev. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.4065/82.2.159>.

GURUNG, Arun Bahadur et al. **Met117 oxidation leads to enhanced flexibility of cardiovascular biomarker- lipoprotein- associated phospholipase A2 and reduced substrate binding affinity with platelet-activating factor**. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 112, p. 831-840, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.210>.

GUSHGARI, Adam J.; HALDEN, Rolf U. **Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines**. *Chemosphere*, [S.L.], v. 210, p. 1124-1136, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.098>.

HARKNESS, J.E; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3ªed, São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1993, 238p.

HUANG, Fubao; WANG, Kai; SHEN, Jianhua. **Lipoprotein-associated phospholipase A2: the story continues**. *Medicinal Research Reviews*, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 79-134, 29 maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/med.21597>.

HUANG, Qi; WU, Yuan; QIN, Chao; HE, Wenwu; WEI, Xing. **Phylogenetic and structural analysis of the phospholipase A2 gene family in vertebrates**. *International Journal Of Molecular Medicine*, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 587-596, 23 dez. 2014. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.2047>.

JESUS, Taíse Bomfim de; CARVALHO, Carlos Eduardo Veiga de. **Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg)**. *Oecologia Australis*, [S.L.], v. 12, n. 04, p. 680-693, dez. 2008. Oecologia Australis. <http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2008.1204.07>

JUAN, Celia Andrés; LALASTRA, José Manuel Pérez de; PLOU, Francisco J.; PÉREZ-LEBEÑA, Eduardo. **The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: outlining their role in biological macromolecules (dna, lipids and proteins) and induced pathologies**. International Journal Of Molecular Sciences, [S.L.], v. 22, n. 9, p. 4642-4662, 28 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22094642>.

KONO, Nozomu; ARAI, Hiroyuki. **Intracellular Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, Type II: Platelet-Activating Factor Acetylhydrolases (Paf-Ah)**. The Enzymes, [S.L.], p. 43-54, 2015. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.enz.2015.09.008>.

KONO, Nozomu; ARAI, Hiroyuki. **Platelet-activating factor acetylhydrolases: an overview and update**. Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids, [S.L.], v. 1864, n. 6, p. 922-931, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.006>.

KRASNER, Stuart W. et al. **Formation, precursors, control, and occurrence of nitrosamines in drinking water: a review**. Water Research, [S.L.], v. 47, n. 13, p. 4433-4450, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.050>.

LEHTINEN, Laura et al. **PLA2G7 associates with hormone receptor negativity in clinical breast cancer samples and regulates epithelial-mesenchymal transition in cultured breast cancer cells**. The Journal Of Pathology: Clinical Research, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 123-138, abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cjp2.69>.

LE MOS, C. T.; TERRA, N. R. **Poluição: causas, efeitos e controle**. Genética toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424 p.

LENZINI, Livia et al. **A twin study of heritability of plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) mass and activity**. Atherosclerosis, [S.L.], v. 205, n. 1, p. 181-185, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.045>.

LIU, Huamin et al. **Association between lipid metabolism and cognitive function in patients with schizophrenia**. Frontiers In Psychiatry, [S.L.], v. 13, p. 1-8, 24 nov. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2022.1013698>.

LIU, Yulong et al. **Current Understanding of Platelet-Activating Factor Signaling in Central Nervous System Diseases**. Molecular Neurobiology, [S.L.], v. 54, n. 7, p. 5563-5572, 9 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0062-5>.

MCCALL, Mark R; LABELLE, Michael; FORTE, Trudy M; KRAUSS, Ronald M; TAKANAMI, Yoshikazu; TRIBBLE, Diane L. **Dissociable and nondissociable forms of platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma LDL: implications for Idl**

oxidative susceptibility. Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids, [S.L.], v. 1437, n. 1, p. 23-36, jan. 1999. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2760\(98\)00177-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2760(98)00177-5).

MCGARRY, Trudy; BINIECKA, Monika; VEALE, Douglas J.; FEARON, Ursula. **Hypoxia, oxidative stress and inflammation.** Free Radical Biology And Medicine, [S.L.], v. 125, p. 15-24, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042>.

MCINTYRE, Thomas M.; PRESCOTT, Stephen M.; STAFFORINI, Diana M. **The emerging roles of PAF acetylhydrolase.** Journal Of Lipid Research, [S.L.], v. 50, p. 255-259, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.r800024-jlr200>.

MELLO, Nicoli et al. **Toxicidade aguda e risco ambiental do malathion aplicado em nebulização contra Aedes aegypti para organismos aquáticos.** Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 571-578, 2021. BJAER - Brazilian Journal of Animal and Environmental Research.
<http://dx.doi.org/10.34188/bjaerv4n1-049>.

MITCH, William A. et al. **N-Nitrosodimethylamine (NDMA) as a Drinking Water Contaminant: a review.** Environmental Engineering Science, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 389-404, set. 2003. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/109287503768335896>.

MOUCHLIS, Varnavas D. et al. **Lipoprotein-associated phospholipase A 2: a paradigm for allosteric regulation by membranes.** Proceedings Of The National Academy Of Sciences, [S.L.], v. 119, n. 2, p. 1-10, 7 jan. 2022.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2102953118>.

MOUCHLIS, Varnavas D.; DENNIS, Edward A. **Phospholipase A2 catalysis and lipid mediator lipidomics.** Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids, [S.L.], v. 1864, n. 6, p. 766-771, jun. 2019. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.010>.

NARDINI, Marco; DIJKSTRA, Bauke W. **α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing.** Current Opinion In Structural Biology, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 732-737, dez. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0959-440x\(99\)00037-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0959-440x(99)00037-8).

NOTO, Hiroshi et al. **The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in the metabolic syndrome and diabetes.** Journal Of Diabetes And Its Complications, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 343-348, nov. 2006. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2006.07.004>.

PANDE, Abhay H. et al. **Membrane lipid composition differentially modulates the function of human plasma platelet activating factor-acetylhydrolase.** Biochimica Et

Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids, [S.L.], v. 1811, n. 1, p. 46-56, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.09.002>.

PARK, Jong-Eun et al. **Distribution of Seven N-Nitrosamines in Food**. Toxicological Research, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 279-288, 30 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.5487/tr.2015.31.3.279>.

PINZI, Luca; RASTELLI, Giulio. **Molecular Docking: shifting paradigms in drug discovery**. International Journal Of Molecular Sciences, [S.L.], v. 20, n. 18, p. 4331-4354, 4 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20184331>.

PORTO, Murilo de Jesus et al. **Avaliação toxicológica: alterações em biomarcadores desencadeadas por exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos**. Research, Society And Development, [S.L.], v. 10, n. 1, 11 jan. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11859>.

RAHMAN, Iffat et al. **Genetic and environmental regulation of inflammatory CVD biomarkers Lp-PLA2 and IgM anti-PC**. Atherosclerosis, [S.L.], v. 218, n. 1, p. 117-122, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.038>.

SAMANTA, Uttamkumar; BAHNSON, Brian J. **Crystal Structure of Human Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase**. Journal Of Biological Chemistry, [S.L.], v. 283, n. 46, p. 31617-31624, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m804750200>.

SAMQUACH, Nhat D.; ARNOLD, Robert D.; CUMMINGS, Brian S. **Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease**. Biochemical Pharmacology, [S.L.], v. 90, n. 4, p. 338-348, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.05.022>. ANTA, Uttamkumar;

SANTOS FILHO, Osvaldo Andrade; ALENCASTRO, Ricardo Bicca de. **Modelagem de proteínas por homologia**. Química Nova, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 253-259, mar. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000200019>.

SEELIGER, Daniel; GROOT, Bert L. de. **Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina**. Journal Of Computer-Aided Molecular Design, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 417-422, 17 abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>.

SHARMA, Prince; CHADHA, Pooja. **Bisphenol A induced toxicity in blood cells of freshwater fish Channa punctatus after acute exposure**. Saudi Journal Of Biological Sciences, [S.L.], p. 1-13, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.088>.

SHARMA, Prince; CHADHA, Pooja. **Bisphenol A induced toxicity in blood cells of freshwater fish *Channa punctatus* after acute exposure**. Saudi Journal Of Biological Sciences, [S.L.], p. 1-13, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.088>.

SHUKLA, Shivendra D. **Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanisms**. The Faseb Journal, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 2296-2301, mar. 1992. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.6.6.1312046>.

Silva Barbosa Correia, Banny. (2017). **Análise lipidômica de alguns peixes amazônicos**. Campinas, 2017. 10.13140/RG.2.2.32810.67522.

SJÖSTEDT, Evelina et al. **An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain**. Science, [S.L.], v. 367, n. 6482, p. 1-20, 6 mar. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aay5947>.

SRINIVASAN, Prabhavathi et al. **Molecular Model of Plasma PAF Acetylhydrolase-Lipoprotein Association: insights from the structure**. Pharmaceuticals, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 541-557, 8 mar. 2010. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph3030541>

STAFFORINI, Diana M. et al. **Biology of Platelet-activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH, Lipoprotein Associated Phospholipase A2)**. Cardiovascular Drugs And Therapy, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 73-83, 24 out. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10557-008-6133-8>.

STAFFORINI, Diana M. et al. **Human Plasma Platelet-Activating Factor Acetyl hydrolase**. Lipase And Phospholipase Protocols, [S.L.], p. 49-58, 2000. Humana Press. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-581-2:49>.

STAFFORINI, Diana. **Functional Consequences of Mutations and Polymorphisms in the Coding Region of the PAF Acetylhydrolase (PAF-AH) Gene**. Pharmaceuticals, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 94-117, 20 nov. 2009. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph2030094>.

STEFANO, Alessandro de et al. **Lp-PLA2, a new biomarker of vascular disorders in metabolic diseases**. International Journal Of Immunopathology And Pharmacology, [S.L.], v. 33, p. 1-5, jan. 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/2058738419827154>.

TANGUAY, Robert L. **The Rise of Zebrafish as a Model for Toxicology**. Toxicological Sciences, [S.L.], v. 163, n. 1, p. 3-4, 26 abr. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfx295>.

TRAVERS, Jeffrey B. **Platelet-Activating Factor as an Effector for Environmental Stressors**. Lipid Signaling In Human Diseases, [S.L.], p. 185-203, 2019. Springer

International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/164_2019_218.

TRAVERS, Jeffrey B.; ROHAN, Joyce G.; SAHU, Ravi P. **New Insights Into the Pathologic Roles of the Platelet-Activating Factor System**. Frontiers In Endocrinology, [S.L.], v. 12, 15 mar. 2021. Frontiers Media SA.

<http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2021.624132>.

VIJAYARAJ, Panneerselvam, et al. ***In vitro* exposure of tobacco specific nitrosamines decreases the rat lung phospholipids by enhanced phospholipase A2 activity**.

Toxicology *In Vitro*, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 1097-1105, set. 2014. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.05.001>.

WALKER, Samantha Dawn; MCELDFOWNEY, Sharron. **Molecular docking: a potential tool to aid ecotoxicity testing in environmental risk assessment of pharmaceuticals**.

Chemosphere, [S.L.], v. 93, n. 10, p. 2568-2577, nov. 2013. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.074>.

WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A.; CLAMP, M.; BARTON, G. J. **Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench**.

Bioinformatics, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 16 jan. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.

WU, Hongyu et al. **Hypoxia-mediated impaired erythrocyte Lands' Cycle is pathogenic for sickle cell disease**. Scientific Reports, [S.L.], v. 6, n. 1, 20 jul. 2016.

Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep29637>.

WU, Xiaoqing; MCINTYRE, Thomas M.; ZIMMERMAN, Guy A.; PRESCOTT, Stephen M.; STAFFORINI, Diana M. **Molecular characterization of the constitutive expression of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene in macrophages**.

Biochemical Journal, [S.L.], v. 375, n. 2, p. 351-363, 15 out. 2003. Portland Press Ltd..

<http://dx.doi.org/10.1042/bj20030636>.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: IGOR NICODEMO DE OLIVEIRA

Título: "PAF-AH PLASMÁTICA DE DANIO RERIO: construção de modelo estrutural para investigação de interações com nitrozaminas e malathion em enzimas homólogas"

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama	Aprovado
Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira	Aprovado
Dra. Caroline Ramos da Cruz Costa	Aprovado

PARECER:

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que o discente **Igor Nicodemo de Oliveira** obteve o seguinte conceito:

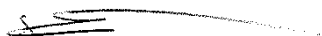
☒ APROVADO

☐ REPROVADO

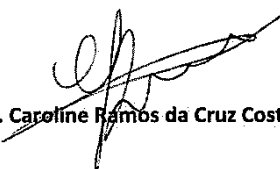
São Vicente, 06 de dezembro de 2023.



Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama



Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira



Dra. Caroline Ramos da Cruz Costa