



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



DOCKING MOLECULAR E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFOLIPASE A2 DO PEIXE *DEVARIO MALABARICUS* EXPOSTO AO INSETICIDA MALATHION

Agatha Manzi De Carli

São Vicente – SP

2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências Campus Litoral
Paulista



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências
Campus Litoral Paulista

**DOCKING MOLECULAR E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA
FOSFOLIPASE A2 DO PEIXE *DEVARIO MALABARICUS*
EXPOSTO AO INSETICIDA MALATHION**

Candidata: Agatha Manzi De Carli

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção
do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

São Vicente - SP

2024

M296d	Manzi, Agatha Docking molecular e atividade enzimática da fosfolipase A2 do peixe <i>Devario malabaricus</i> exposto ao inseticida malathion / Agatha Manzi. -- São Vicente, 2024 61 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente Orientador: Marcos Hikari Toyama Coorientador: Marcos Antonio de Oliveira 1. Biologia Molecular. 2. Bioinformática. 3. Bioquímica. I. Título.
-------	---

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE AGATHA MANZI DE CARLI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA.

Aos 10 dias do mês de setembro do ano de 2024, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de AGATHA MANZI DE CARLI, intitulada **Docking Molecular e Atividade Enzimática da Fosfolipase A2 do Peixe *Devario malabaricus* Exposto ao Inseticida Malathion**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. MARCOS HIKARI TOYAMA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Instituto de Biociências Câmpus do Litoral Paulista / UNESP, Prof. Assoc. RAFAEL MENDONÇA DUARTE (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / UNESP, Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Dr. DANIEL FERREIRA DE LIMA NETO (Participação Virtual) do(a) Universidade Federal de Santa Catarina. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovado _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. MARCOS HIKARI TOYAMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e ao universo pela benção da vida e os ensinamentos que tive ao longo desta jornada desafiadora. Agradeço pela família, ao meu pai querido que partiu cedo demais e deixou muitas saudades, a minha mãe pelo exemplo de força, resiliência e fé e amor. Aos meus irmãos e sobrinha. Agradeço ao meu marido por todo apoio, companheirismo e amor que frutificou e nos presenteou com um filho incrível.

Agradeço ao professor Marcos Hikari Toyama pela orientação neste trabalho e ao professor Marcos Antonio de Oliveira pela co-orientação.

Agradeço ao Seção Técnica de Graduação e Pós-graduação pelo apoio fundamental para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - 88887.758536/2022-00.

RESUMO

As fosfolipases são enzimas de crucial importância para a síntese de mediadores inflamatórios tais como tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas que dependem da geração de ácido araquidônico. O malathion é um inseticida organofosforado atualmente utilizado para controle de insetos na agricultura e vetores de doenças como a dengue em áreas urbanas. Diante disso, este estudo consistiu em uma introdução geral, seguido de análises *in silico* utilizando ferramentas computacionais com o intuito de elucidar a região do sítio ativo, suas estruturas e ligações entre os átomos das moléculas. Dessa forma a proteína fosfolipase A2 citosólica de *Danio rerio* foi modelada de forma comparativa mediante a restrição espacial e o modelo selecionado foi utilizado para análises de docking molecular à fim de prever a interação da proteína com o inseticida organofosforado malathion e seus análogos. O modelo tridimensional da proteína foi construído no software Modeller e os experimentos de docking molecular realizados com o programa AutoDock 4.2.6. As interações foram elucidadas por meio dos aplicativos LigPlot+, Discovery e PyMol, buscando o entendimento sobre a interação do inseticida malathion e seus análogos com as proteínas acima citadas. Posteriormente, foram realizados os testes *in vivo* com a exposição de peixes da espécie *Devario malabaricus* expostos à diferentes concentrações de malathion para identificar a concentração letal e ensaios enzimático. Os resultados da modelagem de proteínas por homologia mostraram um valor de identidade superior a 70% comparando com as sequências de humanos, coelhos e outros animais vertebrados. Foram criados e selecionados modelos da proteína e os mesmos validados para estudos de docking, os resultados mostraram que as regiões dos sítios catalíticos da cPLA2 interagiram com os átomos que compõe o malathion e seus metabólitos por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Os testes *in vivo* resultaram na mortalidade total dos espécimes à partir da concentração de 0,03% e a sobrevivência dos organismos ocorreu apenas nas concentrações 0, 0,01, 0,02%. A concentração letal (CL50) foi de 0,029% para 50% da população. O ensaio enzimático foi realizado com as concentrações 0, 0,02 e 1% e demonstrou que o malathion foi capaz de inibir a atividade enzimática da PLA2 nas concentrações de 0,02 e 1% corroborando com os estudos teóricos. Dessa forma, foi possível corroborar as informações teóricas obtidas nos estudos de docking molecular com o ensaio *in vivo* e o estudo enzimático que o malathion é um inibidor da fosfolipase A2.

Palavras-chave: Modelagem de proteínas; Docking molecular; Fosfolipase A2; Malathion; Agrotóxicos.

ABSTRACT

Phospholipases are enzymes of crucial importance for the synthesis of inflammatory mediators such as thromboxanes, leukotrienes and prostaglandins that depend on the generation of arachidonic acid. Malathion is an organophosphate insecticide currently used to control insects in agriculture and vectors of diseases such as dengue in urban areas. Therefore, this study consisted of a general introduction, followed by *in silico* analyses using computational tools in order to elucidate the region of the active site, its structures and bonds between the atoms of the molecules. Thus, the cytosolic phospholipase A2 protein of *Danio rerio* was modeled comparatively by means of spatial restriction and the selected model was used for molecular docking analyses in order to predict the interaction of the protein with the organophosphate insecticide malathion and its analogues. The three-dimensional model of the protein was constructed in the Modeller software and the molecular docking experiments were performed with the AutoDock 4.2.6 program. The interactions were elucidated using the LigPlot+, Discovery and PyMol applications, seeking to understand the interaction of the insecticide malathion and its analogues with the proteins mentioned above. Subsequently, *in vivo* tests were performed with the exposure of fish of the species *Devario malabaricus* exposed to different concentrations of malathion to identify the lethal concentration and enzymatic assays. The results of protein modeling by homology showed an identity value greater than 70% compared to the sequences of humans, rabbits and other vertebrates. Protein models were created and selected and validated for docking studies, the results showed that the regions of the catalytic sites of cPLA2 interacted with the atoms that make up malathion and its metabolites through hydrophobic interactions and hydrogen bonds. The *in vivo* tests resulted in total mortality of the specimens from the concentration of 0.03% and the survival of the organisms occurred only at concentrations of 0, 0.01, 0.02%. The lethal concentration (LC50) was 0.029% for 50% of the population. The enzymatic assay was performed with concentrations of 0, 0.02 and 1% and demonstrated that malathion was able to inhibit the enzymatic activity of PLA2 at concentrations of 0.02 and 1%, corroborating theoretical studies. Thus, it was possible to corroborate the theoretical information obtained in the molecular docking studies with the *in vivo* assay and the enzymatic study that malathion is an inhibitor of phospholipase A2.

Keywords: Protein modeling; Molecular docking; Phospholipase A2; Malathion; Pesticides.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 AGROTÓXICOS E INSETICIDAS.....	7
1.2 MALATHION.....	8
1.3 A SUPERFAMÍLIA DE ENZIMAS FOSFOLIPASE.....	10
1.4 FOSFOLIPASE A2 CITOSÓLICA (cPLA2)	11
1.5 FOSFOLIPASE A2 EM PEIXES.....	14
1.6 OS PEIXES <i>Danio rerio</i> E <i>Devario malabaricus</i> COMO MODELOS ANIMAIS.....	16
1.7 BIOINFORMÁTICA E ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	17
1.8 MODELAGEM DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA.....	18
1.9 DOCKING MOLECULAR.....	19
1.10 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DA ENZIMA MOLDE E ALVO.....	23
3.2 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DO MODELO.....	23
3.3 VALIDAÇÃO DO MODELO.....	23
3.4 DOCKING MOLECULAR.....	24
3.4.1 PREPARAÇÃO DOS ARQUIVOS DO LIGANTE E MOLÉCULA ALVO.....	24
3.4.2 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR.....	24

3.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFOLIPASE A2.....	25
3.5.1 CULTIVO E MANEJO DOS ORGANISMOS.....	25
3.5.2 TESTE DE EXPOSIÇÃO AO MALATHION <i>IN VIVO</i>	26
3.5.3 EXPERIMENTOS BIOQUÍMICOS.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1 ALINHAMENTOS DAS SEQUÊNCIAS.....	27
4.2 CONSTRUÇÃO DO MODELO.....	29
4.3 VALIDAÇÃO.....	29
4.4 DOCKING MOLECULAR.....	30
4.5 EXPOSIÇÃO AO MALATHION.....	34
4.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFOLIPASE A2.....	34
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO I.....	52
ANEXO II.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS E INSETICIDAS

A utilização de compostos químicos para controle de proliferações de insetos ocorre desde os anos de 1700 e desde então o número de produtos para esta finalidade só aumentou. Pesticidas são compostos químicos utilizados no controle de pragas urbanas e aplicados em sistemas de agricultura e armazenamento de grãos (FRIEDRICH *et al.*, 2021; ETO, 2018; MAHMOOD *et al* 2016; POOL *et al.*, 2005).

No Brasil, agentes biológicos, físicos ou químicos utilizados para controle e extermínio de pragas são definidos como agrotóxicos e estão descritos no Artigo 2º, Inciso I da Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Regimentado pelo decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2015). Em relação à quantidade de agrotóxicos utilizados anualmente, o Brasil é um dos países que mais se aplica compostos químicos, em razão da agricultura ser a atividade econômica predominante na maioria dos estados brasileiros. Como consequência do aumento na produção de alimentos, o número de agroquímicos multiplicou-se desde os anos 1970 até a atualidade (DAUFENBACK *et al.*, 2022; DA SILVA; DE-CARLI, 2021; PIGNATI *et al.*, 2017).

A classificação dos pesticidas é realizada de acordo com a sua função, por exemplo: acaricida, inseticida, larvicida, ovicida, raticida, etc. Também em relação à sua procedência, de origem vegetal, bacteriana e fúngica ou compostos orgânicos e inorgânicos. Pesticidas orgânicos possuem alta capacidade de ação fisiológica e sua composição química compreende átomos de carbono. Dentre este grupo os mais relevantes são os organoclorados e organofosforados (OF). Os organoclorados são compostos que apresentam átomos de cloro e carbono em sua composição, o que lhes conferem alta durabilidade e prejuízo ao meio ambiente, aos animais e humanos devido à sua lipossolubilidade podem bioacumular em tecidos adiposos (AMARO, 2012; AMARO, 2008; SANCHES *et al.*, 2003).

Os OF são compostos químicos que contém átomos de carbono e fósforo em sua composição. São comercializados para diversas finalidades como agricultura, usos domésticos e controle de vetores de doenças. Encontram-se disponíveis em: aerossol, granulado, líquido, em emulsões, pó e pastilhas. O motivo principal da utilização dos OFs é sua atividade biológica no sistema nervoso, meia vida curta, além de ter um baixo custo e fácil produção (VINHAL; SOARES 2018; BARBOSA *et al* 2009; SANTOS *et al.*, 2007).

Os OFs englobam compostos como o malathion, parathion, diclorvos, dimetildiclorovinilfosfato e tetraetilpirofosfato. Estes compostos de forma geral são drogas que inibem a colinesterase, uma enzima que regula o sistema nervoso central (MELLO *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2007; DASZAK *et al.*, 2003).

OFs são moléculas de rápida degradação no ambiente depois de aplicado e essa característica tem sido a principal justificativa de seu largo emprego, o malathion bem como outros organofosforados quando aplicados no ambiente, podem dar origem a outras formas óxon denominados como análogos (TERRY, 2012; DOHERTY *et al.*, 2019; HOU *et al.*, 2021).

In vitro, OFs exercem ação tóxica pela sua forte capacidade de inibição da acetilcolinesterase (AChE), que é uma enzima crucial no processo de recaptação e hidrólise da acetilcolina (ACh) e no caso dos OFs, seus análogos podem ligar-se irreversivelmente ao citocromo P450 que é a principal enzima responsável pela biotransformação de várias moléculas tóxicas que entram na circulação sanguínea dos organismos (CAVALCANTE *et al.*, 2016; PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014; ELLISON *et al.*, 2012).

1.2 MALATHION

Um dos OFs mundialmente utilizado é o malathion (MLT) (IUPAC: Diethyl 2-[(dimethoxyphosphorothioyl)sulfanyl]succinate), classificado como alifático, ou seja, um composto orgânico que apresenta cadeia aberta e os átomos que o compõem não formam anéis de benzeno. Desenvolvido durante a segunda guerra Mundial como gás e patenteado pelos Estados Unidos como inseticida em 1956, desde então é amplamente utilizado até o momento. Este composto está registrado no Brasil para diversos usos como controle de pragas em cultivos de frutas, legumes, hortaliças, armazenamento de grãos e jardinagem em geral. É classificado como classe III, indicado para uso veterinário contra ectoparasitas de animais de grande e pequeno porte em diferentes concentrações. E em relação à saúde pública este inseticida é registrado para controle de diversos insetos, mas especificamente mosquitos vetores de doenças como o *Aedes aegypti*. Pode ser aplicado por nebulização ou até mesmo por aeronaves em caso de surto das doenças causadas pelo inseto (BRASIL, 2015; RIOS *et al.*, 2019; MAGALHÃES *et al.*, 2021).

O MLT apresenta fórmula química $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ e peso molecular de 330.4 g/mol. Pode ser produzido de forma líquida, pura e acromática ou concentrada (90%) com coloração âmbar.

Devido a sua fácil decomposição no ambiente, é imprescindível que o sistema de armazenamento tenha condições adequadas ao abrigo de luz e com pouca umidade. Com capacidade de ser dissolvido tanto em água (145 mg/L) quanto em outros solventes orgânicos como álcool, cetona, óleos vegetais, entre outros (FRIEDRICH *et al.*, 2021; TCHOUNWOU *et al.*, 2015).

Devido à facilidade de acesso e praticidade na aplicação, o MLT pode ser usado de forma incorreta e provocar intoxicações para os animais e seres humanos e contaminar rios e reservatórios. Além de se propagar e interagir no ambiente de forma que pode ser encontrado na água (superficial e subterrânea), no ar, no solo e até em alimentos (frutas, legumes e verduras) (DA SILVA *et al.*, 2020; GULARTE *et al.*, 2018; MACHERA *et al.*, 2003).

No ambiente, este composto é degradado por ações biológicas (animais e plantas), fotólise e hidrólise. Além disso, dependendo das condições físico-químicas do meio no qual é manipulado, pode sofrer alterações e formar análogos. Estes similares podem ser tão tóxicos quanto o próprio MLT e por apresentarem maior solubilidade, tornam-se contaminantes ainda mais resistentes na natureza. Em contato com água a sua degradação provém do pH, se este for 8.0 a hidrólise ocorre rapidamente em poucos dias. Em pH 6.0 pode levar semanas para ser degradado totalmente no ambiente e originar análogos como o malaóxon, dietil fumarato, ácido dicarboxílico e monocarboxílico (DA SILVA *et al.*, 2013; FAY *et al.*, 2008; NEWHART, 2006).

A molécula de MLT possui característica lipofílica, ou seja, possui afinidade e solubilidade por lipídios. A absorção deste composto pode ocorrer através do contato com a pele, por inalação ou ingestão. Na circulação, este inseticida tem como destino o fígado onde será degradado por meio de processos de detoxificação a partir de hidrólises catalíticas que envolve a enzima citocromo P450 (CYP) (KARMAKAR *et al.*, 2023; HUANG *et al.*, 2015; NARAHARISSETTI *et al.*, 2009; HODGSON, 2003).

Quando o MLT entra na circulação sanguínea, este desloca-se para o sistema nervoso central onde atravessa a barreira hematoencefálica e provoca a inibição da acetilcolinesterase (AChE) (COSTA, 2006). Esta enzima é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (Ach) que promove as sinalizações neuronais em fendas sinápticas. A inibição enzimática ocasiona no acúmulo de Ach nas sinapses do sistema nervoso central e periférico

provocando síndromes colinérgicas (TCHOUNWOU *et al.*, 2015; BANASIK *et al.*, 2003; ABOU EL ELLA, 2008).

Os OFs presentes no plasma e no fígado podem também interagir com as β -esterases e carboxiesterases. Estas enzimas atuam como sequestradoras de grupos fosfatos (scavengers moleculares) por causa da capacidade destas moléculas ligarem-se ao grupo fosfato do organofosforado, por meio de uma serina reativa e histidina neutralizando a capacidade reativa dos compostos (MAKHAEVA *et al.*, 2013; MASSON *et al.*, 2008).

Experimentos com diversos animais em condições experimentais demonstram que esterases plasmáticas, são responsáveis pela hidrólise de ésteres de drogas no plasma e apresentam importância na neutralização da ação tóxica dos inseticidas e seus derivados, mas isso depende da concentração destas enzimas, uma vez que os OFs têm uma maior afinidade ao sítio ativo da acetilcolinesterase. O acúmulo de AChE leva a uma hiperestimulação colinérgica no sistema nervoso parassimpático. A inibição desta enzima é reversível, devido às interações metabólicas, mas principalmente pela fosforilação do grupo hidroxila encontrado no resíduo de aminoácido serina (ROCHA; SPINOSA, 1992; SLOTKIN, 2004; ROBERTS; AARON, 2007; ČALIĆ *et al.*, 2006; ABOU-DONIA, 2003).

1.3 A SUPERFAMÍLIA DE ENZIMAS FOSFOLIPASE

Fosfolipídios são moléculas essenciais para todos os tipos de organismos. Constituídos por uma parte hidrofóbica conhecida como “cauda”, composta por duas cadeias de grupo acil saturada e insaturada e outra hidrofílica denominada “cabeça” integrada por um grupo fosfato o qual pode ser modificado. Todas as membranas celulares são compostas por fosfolipídios, além de canais de sódio, enzimas e proteínas de membrana responsáveis por controlar a permeabilidade e o equilíbrio osmótico celular (MOUCHLIS; DENNIS, 2019; SAHU *et al.*, 2007).

As enzimas fosfolipases podem degradar os fosfolipídios em quatro sítios diferentes da molécula, originando cinco diferentes classes. A PLA1 cliva-se na posição sn-1, resultando em 2-acil-lisofosfolípidos e ácidos graxos. A PLA2 cliva-se na posição sn-2 acarretando em 1-acil-lisofosfolípidos e ácidos graxos. A PLB, também conhecida como lisofosfolipase, funciona como as enzimas PLA1 e PLA2, uma vez que hidrolisa os fosfolipídios na posição sn-1 e também em sn-2. PLA1, PLA2, e PLB são referidos em conjunto como hidrolases acil. As

outras duas classes são consideradas fosfodiesterases. A PLC hidrolisa fosfolípidos antes do grupo fosfato e a PLD hidrolisa após o grupo fosfato (Figura 1) (DENNIS, 1994; ARAÚJO, 2014; QUACH *et al.*, 2014).

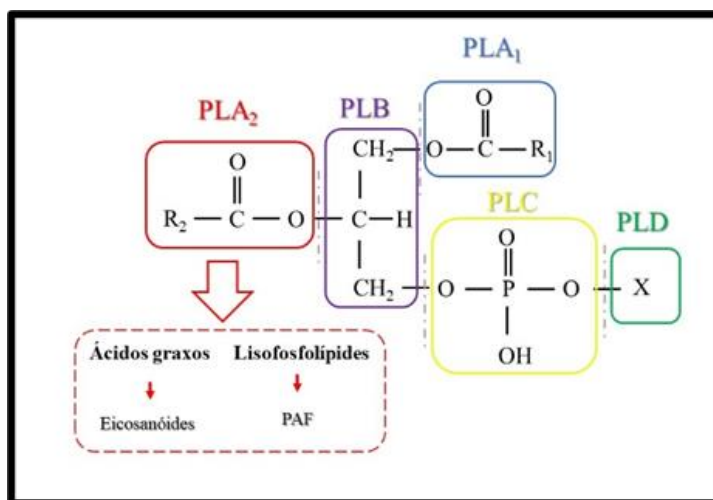


Figura 1: Esquema especificado das fosfolipases e a clivagem específica para cada classificação.

Nos últimos 50 anos, foram identificados seis tipos principais de enzimas fosfolipase A2 (PLA2): PLA2 secretórias (sPLA2), PLA2 citosólica (cPLA2), iPLA2, Lp-PLA2 (também conhecida como PAF-AH), LPLA2, e AdPLA2. Estas enzimas utilizam uma díade catalítica para realizar a hidrólise da ligação éster na posição sn-2 dos substratos que são os fosfolípidos e originam dois produtos os ácidos graxos livres e lisofosfolípidos que podem atuar de várias maneiras. O ácido araquidônico (AA) é um produto da ligação enzima-substrato, o qual é convertido em eicosanóides e prostaglandinas. E os lisofosfolípidos podem induzir vários efeitos farmacológicos, convertendo-se em fator de agregação plaquetária (PAF) (VASQUEZ *et al.*, 2019 e MOUCHLIS; DENNIS, 2019).

Técnicas computacionais combinadas com dados de espectrometria de massa têm sido utilizadas com sucesso para compreender o mecanismo de ação das PLA2, bem como as propriedades estruturais e físico-químicas do seu sítio ativo. Além disso, estes estudos mostram que a presença da díade catalítica é crucial para a atividade enzimática, permitindo que estas enzimas cumpram um papel significativo no desenvolvimento de doenças inflamatórias, devido a geração de vários intermediários pró-inflamatórios. Entretanto, sua ativação ou a mobilização dependem da interação com as diferentes vias de sinalização, incluindo a modulação por sPLA2 via receptores acoplados à proteína G (VASQUEZ *et al.*, 2019; MOUCHLIS; DENNIS, 2019).

1.4 FOSFOLIPASE A2 CITOSÓLICA (cPLA2)

A família cPLA2 compreende seis enzimas intracelulares denominadas fosfolipase A2 citosólica: alfa (cPLA2 α), cPLA2beta, cPLA2gamma, cPLA2delta, cPLA2epsilon e cPLA2zeta. Estas enzimas apresentam alto peso molecular e possuem uma díade catalítica Ser/Asp conservada. São caracterizadas pela presença de um domínio C2 em sua região N-terminal, com exceção da cPLA2 γ , na qual esse domínio está ausente. Este domínio é responsável pela associação da enzima com as membranas e desempenha uma função determinante em relação à direção específica para as membranas intracelulares e plasmática (GHOSH *et al.*, 2006; BAVEC, 2011; LESLIE, 2015; STAHELIN, 2016).

A expressão de cPLA2 α ocorre em diversas células de mamíferos mediando a produção de produtos lipídicos funcionalmente diversos em resposta a estímulos extracelulares. Apresenta atividade de PLA2 e lisofosfolipase, sendo a única com especificidade para substratos fosfolipídicos contendo AA. Estas enzimas cPLA2 pertencem ao grupo IVA das PLA2, possuem 749 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 85 kDa. Apresentam dois domínios distintos, um é regulatório, onde localiza-se a região amino-terminal e denomina-se domínio C2. O outro é o catalítico independente de Ca²⁺ α/β hidrolase, onde estão presentes os resíduos da díade catalítica (Ser 223/Asp 549) (HIRABAYASHI; SHIMIZU, 2000; BURKE; DENNIS, 2009; LESLIE, 2015).

Diversos tipos celulares apresentam as cPLA2 em seus citoplasmas como os macrófagos, plaquetas e células do rim, Para hidrolisar fosfolipídeos e promover a liberação de AA. Também são capazes de regular processos fisiológicos normais e patológicos como asma, artrite e outras doenças inflamatórias. A função de regulação da cPLA2 em sistemas fisiológicos, como o controle da homeostase e reprodução feminina, pode ser atribuída a diferentes mediadores lipídicos (HIRABAYASHI *et al.*, 2004; LESLIE, 2004; LASLIE, 2015).

A ativação da cPLA2 envolve processos pós-traducionais como o aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular, fosforilação por proteína-quinase específica de serina e treonina (MAPK) e ficotoxinas (ácido ocadaico). A fosforilação por MAPKs nos resíduos de serina 505 e 727 localizados no domínio catalítico, promove a otimização da atividade enzimática (CLARK *et al.*, 1995; DAS *et al.*, 2003; KOKOTOU *et al.*, 2017).

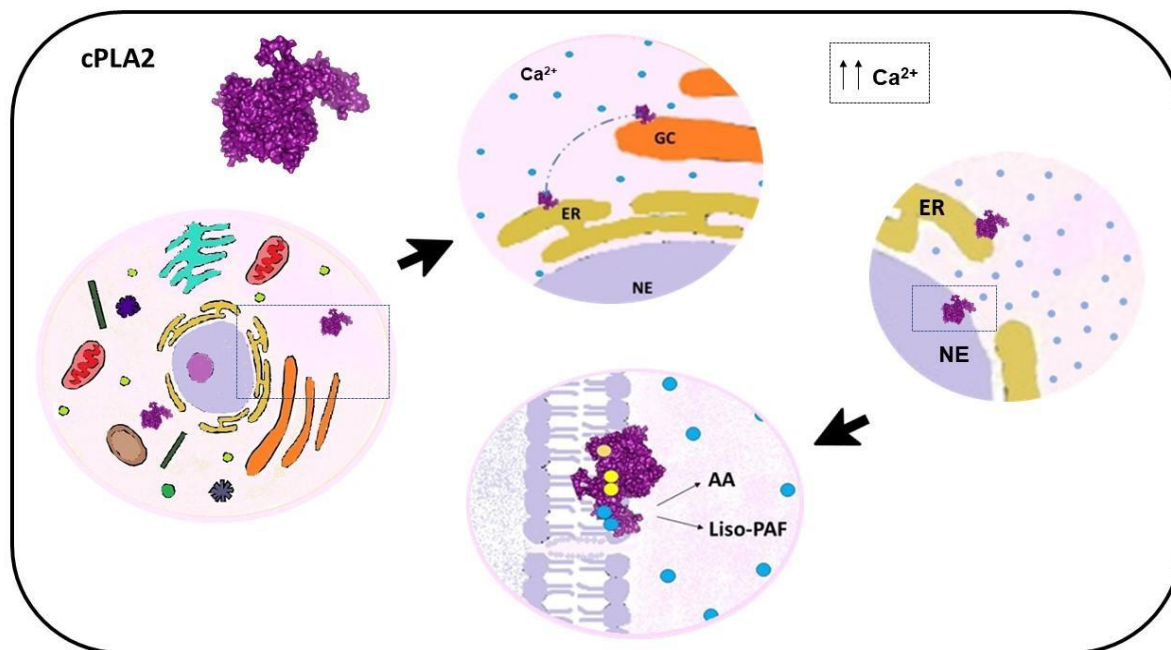


Figura 2: Sinalização celular das enzimas PLA2 a partir do aumento de Ca^{2+} , deslocamento da enzima para as membranas intracelulares e a clivagem dos fosfolipídios. Legendas: AA ácido araquidônico; GC: Complexo de Golgi; ER: retículo endoplasmático; NE: envelope nuclear.

O controle da regulação da enzima é complexa e envolve mecanismos de alteração dos níveis de Ca^{2+} intracelular. O aumento da concentração deste íon é capaz de ativar a enzima e promover a translocação do citoplasma para a região de membrana do retículo endoplasmático, onde ligam-se dois íons de Ca^{2+} na face de ligação do domínio C2. Esta ligação proporciona um aumento da hidrofobicidade da região, permite a translocação e garante a estabilidade da proteína à membrana (DAS *et al.*, 2003; HIRABAYASHI; SHIMIZU, 2004; LESLIE, 2015).

Dessa forma, o domínio catalítico que é independente de Ca^{2+} alcança a região da membrana e se liga com o auxílio do resíduo de Trp 464, o qual é responsável por estabelecer esta ligação. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} promove o deslocamento da enzima que desloca-se do retículo endoplasmático (RE) para a região de membrana do envelope nuclear. Assim, novamente a face de ligação de Ca^{2+} liga-se à membrana, o resíduo Trp 464 estabiliza a enzima e o sítio catalítico é ativado promovendo a clivagem dos fosfolipídios (GIJON *et al.*, 1999; DESSEN, 2000; LESLIE, 2015).

Durante o processo de hidrólise dos fosfolipídios na posição sn-2 da membrana, a cPLA2 medeia a produção de compostos derivados de ácidos graxos e lisofosfolipídios. Portanto, a cPLA2 ativada proporciona a produção de AA e possui três possíveis vias:

participação no processo de remodelação da membrana celular, liberação no meio extracelular por difusão ou metabolismo intracelular. Além disso, o AA produzido segue em vias enzimáticas distintas conduzidos pelas enzimas ciclooxigenases, lipooxigenases localizadas no complexo de Golgi e retículo endoplasmático (GIJÓN; LASLIE, 1999; LASLIE, 2004; TALLIMA; RIDI, 2018).

As enzimas cPLA2 são responsáveis por controlar o fluxo da membrana intracelular, estão envolvidas na formação de membranas tubulares que interligam o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. E hidrolisam lipídios envolvidos em processos de resposta imunológica e inflamatória os quais se tornam substratos para outras enzimas como o PAF (fator de ativação de plaquetas) (BURKE; DENNIS, 2009; SCHAEFFER *et al.*, 2011).

1.5 FOSFOLIPASE A2 EM PEIXES

Os lipídios são a fonte de energia para os peixes e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento das larvas e da membrana celular, enfatizando a importância do entendimento da composição de lipídios e ácidos graxos. Também é reconhecido que fatores ambientais como temperatura, salinidade, luz ou o tipo de alimento influenciam os teores de lipídios e ácidos graxos dos organismos aquáticos. Mudanças sazonais ou geográficas também têm um efeito significativo na bioquímica animal. Essas alterações ambientais afetam principalmente os processos metabólicos que podem variar nos diferentes órgãos dos organismos aquáticos (DANTAGNAN *et al.*, 2007; KURTOVIC *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2014).

A mobilização lipídica em vertebrados além de ser uma reserva energética para a manutenção do crescimento, também fornece compostos importantes para a biogênese da membrana à medida que ela se desenvolve. As reservas lipídicas encontradas nos peixes são a principal fonte de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, especialmente ômega-3 e ômega-6, que são cruciais para gerar vários mediadores lipídicos que atuam em diversas reações fisiológicas, na membrana e controle imunológico. Portanto, os lipídios desempenham um papel importante na nutrição dos peixes, pois fornecem energia e ácidos graxos essenciais (TOCHER, 2003; MARTIN *et al.*, 2017).

Por outro lado, uma pesquisa mostra que os peixes requerem ácidos graxos altamente insaturados n-3 (n-3 HUFA), particularmente o ácido eicosapentaenoico (20: 5n-3; EPA) e ácido docosahexaenóico (22: 6n-3; DHA), para o crescimento normal e para servir como

componentes estruturais durante a organogênese, como membranas celulares (músculos, cérebro, retina) e precursores eicosanoides, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Entre as várias enzimas envolvidas no processo de metabolização lipídica estão as PLA2. No caso do metabolismo lipídico da dieta, a maior parte desse processo é feito pela mobilização de PLA2 secretoras pelas células acinares pancreáticas que permitem a digestão eficaz dos fosfolipídios alimentares. Esses fosfolipídios produzem ácidos graxos como o AA e lisofosfolipídios. Em geral, essa reação é mais conhecida como etapa inicial, pois limita a velocidade do metabolismo do araquidonato e a produção do mediador lipídico bioativo (BALSINDE *et al.*, 2002; FARHOUDI *et al.*, 2011).

O processo de digestão, absorção e transporte de lipídios em peixes é semelhante ao observado em mamíferos, com algumas diferenças devido à complexidade do trato digestivo e às diferenças anatômicas dos peixes quando comparados a várias espécies. Essa variabilidade ocorre de acordo com os hábitos alimentares dos animais (onívoros, herbívoros ou carnívoros), o que determina, entre outros aspectos, o comprimento do trato digestório e a produção enzimática de cada espécie (RIBEIRO *et al.* 2007; BAKKE *et al.*, 2010; MORAES; DE ALMEIDA, 2020).

A maior parte da digestão dos alimentos ocorre no intestino e ceca pilórica de peixes. As secreções intestinais contêm um grande número de enzimas, como proteases, lipases e carboxilases, que hidrolisam as três respectivas classes de nutrientes e que são dependentes do substrato. A atividade lipolítica, que é a quebra da gordura em ácido graxo e glicerol, ocorre em vários extratos do pâncreas, fígado, intestino e ceco pilórico de peixes, da mesma forma que ocorre em mamíferos. As lipases pancreáticas secretadas no lúmen intestinal são as mais importantes na digestão das gorduras. Peixes carnívoros apresentam maior atividade lipásica do que peixes onívoros e herbívoros (ROTTA, 2003; SMICHI *et al.*, 2012).

Os fosfolipídios fazem parte da dieta lipídica dos peixes, mas são escassos os estudos que elucidam a digestão dessas frações. Esses lipídios constituem a bicamada da membrana celular e mantêm funções celulares como absorção, transporte, assimilação de lipídios, síntese de eicosanoides, ação hormonal, etc. Essas funções fazem do fosfolipídio ser um nutriente essencial para a nutrição larval de peixes. Particularmente, os fosfoacilgliceróis na posição sn-2 são hidrolisados pelas PLA2 pancreáticas ou intestinais, resultando em lisofosfolipídios e

ácidos graxos que, por sua vez, são absorvidos pela mucosa intestinal (TOCHER, 2003; CHOWDHURY *et al.*, 2019).

Entre os vários ácidos graxos poli-insaturados essenciais para peixes teleósteos está o AA, que pode ser significativamente abundante em certas espécies. O AA podem desempenhar diversas funções regulatórias e essenciais em vertebrados e, no caso dos peixes, o controle da geração de AA parece estar envolvido na sua maturação sexual, desenvolvimento ontogenético dos peixes, crescimento somático, regulação da pressão osmótica, manutenção do treinamento e manutenção neural em peixes. Com relação ao desenvolvimento larval, a expressão de amilase diminui com o aumento da idade, enquanto a expressão de outras enzimas, como a PLA2 e também a tripsina, aumenta consideravelmente até o final do período larval (IZQUIERDO *et al.*, 2001; CAHU; ZAMBONINO, 2001; SORBERA *et al.*, 2001; NORAMBUENA *et al.*, 2015; NAYAK *et al.*, 2017; MASOUDI *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2017; GONZÁLES-MIRA *et al.*, 2018).

1.6 OS PEIXES *Danio rerio* E *Devario malabaricus* COMO MODELOS ANIMAIS

Nos peixes podem ser observadas várias respostas biológicas em decorrência de estressores, tais como a bioacumulação de químicos e biomarcadores que expressam variações fisiológicas e até morfológicas. Dessa forma, destacam que os peixes são elementos importantes para o biomonitoramento da poluição da água devido a características intrínsecas específicas. Dentre elas destacam-se: (a) tamanho relativamente grande, (b) longo ciclo de vida, (c) facilidade de crescimento, etc. Além disso, os peixes têm uma posição privilegiada na cadeia alimentar e podem afetar diretamente a saúde dos humanos, o que aumenta ainda mais a sua importância. Assim, os peixes possuem uma estreita relação com a condição ambiental do meio aquático. A grande maioria de contaminantes são de características lipofílicas, o que favorece sua ligação com moléculas lipídicas e sua rápida absorção pelas células e posterior bioacumulação nos tecidos. (VAN DER OOST *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2008; WALKER *et al.*, 2012)

O peixe *Danio rerio*, conhecido no Brasil como zebrafish ou paulistinha, é utilizado por diversos pesquisadores a nível mundial. É um vertebrado diplóide que pode ser facilmente mantido e distribuído em aquários necessitando de pouco espaço considerado um modelo seguro na pesquisa toxicológica, medindo aproximadamente entre três e quatro centímetros, este teleósteo. Além disso, possui baixo custo de manutenção, alta taxa de fecundidade e seus

embriões são transparentes e possuem uma rápida maturação sexual entre três e seis meses (HILL *et al.*, 2005).

O aumento no número de artigos publicados usando o *Danio rerio* está diretamente ligado ao crescente conhecimento sobre esta espécie. O sequenciamento do genoma, iniciado pelo Instituto Senger em 2001, possibilitou o uso em diversos estudos genéticos. Pesquisas relacionadas com genes humanos são cada vez mais desenvolvidas utilizando este modelo animal, uma vez que o seu genoma apresenta alto grau de similaridade com os genomas de humanos e de camundongos (BARBAZUK *et al.*, 2000; LIESCHKE; CURRIE, 2000; STERN; ZON 2003).

As análises filogenéticas de PLA2, mostram que o *Danio rerio* e outros peixes apresentam ao menos três grupos de PLA2: duas secretórias e um grupo de PLA2 citosólicas. As sPLA2-Lp são referidas como PLA2 do Grupo 7 ou simplesmente G7 e já no caso das PLA2 citosólicas encontradas tanto em zebrafish e seres humanos são representados pelas PLA2 grupos G4 sendo esta terminologia usada como forma de separar as PLA2 de mamíferos em grandes grupos (HUANG *et al.*, 2015; MURAKAMI *et al.*, 2015).

O peixe *Devario malabaricus*, assim como o zebrafish, são teleósteos e pertencem a família cyprinidae. Exemplares adultos do gênero *Devario* são comumente conhecidos na aquarioria como *Danio gigante* e utilizados em vários tipos de pesquisas por se tratar de um modelo animal semelhante ao *Danio rerio*. No entanto, possuem um tamanho corporal muito superior e podem alcançar cerca de 15 cm de comprimento, o que possibilita a melhor compreensão dos mecanismos celulares e fisiológicos em experimentação animal (KULLANDER *et al.*, 2017; SHIFATU *et al.*, 2018; CHAGAS *et al.*, 2016).

1.7 BIOINFORMÁTICA E ANÁLISE IN SILICO

A bioinformática é uma ciência que surgiu no início da década de 1950 com o trabalho escrito por James Watson e Francis Crick publicado na revista Nature, o qual descreveu sobre as bases moleculares, replicação e tradução do material genético, permitindo o melhor entendimento sobre as bases do DNA também conhecida como sequência de letras (WATSON; CRICK, 1953). A partir desta descoberta, o desenvolvimento de ferramentas através da interdisciplinaridade das grandes áreas como a biologia molecular e celular, bioquímica, química física, computação aliada aos avanços da tecnologia proporcionou a progressão da

bioinformática estrutural contendo questões biológicas com um ponto de vista tridimensional. Em meados de 1965 alguns cientistas contribuíram para a sistematização de dados das estruturas tridimensionais das proteínas. A pesquisadora físico-química Margaret Dayhoff contribuiu de forma imprescindível para o uso de computadores nos estudos de biomoléculas, iniciando a representação dos aminoácidos com uma única letra (VERLI, 2014). O desenvolvimento de computadores com melhor performance possibilitou o entendimento da dinâmica e enovelamento das proteínas. A criação de banco de dados de informações biológicas, o desenvolvimento de novas metodologias e a investigação de novas hipóteses, contribuíram para a bioinformática se tornar uma área bastante promissora. Dentre as inúmeras aplicações, pode-se destacar a busca e identificação de proteínas relacionadas a processos patológicos e também alvos potenciais para a produção de novos medicamentos (DE ARAUJO *et al.*, 2008).

As inovações tecnológicas proporcionou um avanço da bioinformática e a metodologia *in silico* com diversos programas computacionais para análises de maior complexidade em relação às informações, função e a estrutura terciárias de proteínas bem como predizer as possíveis implicações destas em contato com inibidores de ligantes (CALABRESE *et al.*, 2009, CAPRILES *et al.*, 2010; CAPRIOT; ALTMAN, 2011).

1.8 MODELAGEM DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA

Proteínas são classificadas em famílias ou superfamílias e, quando originam-se de um ancestral comum e apresentam semelhanças estruturais e funcionais são consideradas proteínas homólogas. O grau de identidade ou homologia entre as proteínas de uma mesma família é superior quanto a sequência primária do que a sua estrutura terciária (tridimensional) (MANNHOLD *et al.*, 2008).

Métodos de modelagem por homologia são utilizados para elucidar a estrutura terciária de proteínas e são cada vez mais utilizados em proteômica. Também conhecida como modelagem comparativa de proteínas, é um dos métodos de modelagem mais precisos e pode produzir modelos através de sequências primárias já existentes (SANTOS-FILHO *et al.*, 2003).

Todos os métodos atuais de modelagem de proteína por homologia tem como preceito o grau de identidade entre a sequência primária da proteína-alvo e as estruturas tridimensionais das proteínas-moldes. Dessa forma, a metodologia consiste em quatro etapas: identificação e seleção de proteína-molde, alinhamento das sequências de resíduos, construção das coordenadas

do modelo e avaliação da qualidade (SANTOS-FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Métodos de modelagem por comparação com estruturas conhecidas promovem aplicações importantes para o estudo de compostos bioativos. A modelagem de proteínas por homologia permite que seja desenvolvido estudos *in silico* com proteínas que ainda não foram cristalografadas por raio-X e ressonância magnética nuclear (YOKOYAMA *et al.*, 2000).

Portanto, esta técnica de baixo custo apresenta um considerável potencial por ser capaz de adiantar processos laboratoriais de alto valor e longa duração. Uma ferramenta adaptada para estudos teóricos de proteínas, amplamente utilizada em pesquisas fundamentais e também nas indústrias farmacêuticas em técnicas de reposicionamento de fármacos. Além disso, auxilia em estudos sobre a interação de proteínas com possíveis bioligantes (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008).

1.9 DOCKING MOLECULAR

Docking molecular é uma técnica *in silico* bem estabelecida que tem como principal objetivo o descobrimento de novos compostos e sua relação com macromoléculas. Esta técnica é capaz de simular a afinidade das ligações entre os receptores e ligantes, buscando a afinidade de ligação (GUEDES *et al.*, 2014; JAKHAR *et al.*, 2020).

Amplamente aplicado em programas de descoberta de novas drogas, o docking molecular é um método *in silico* que prevê a ligação de uma determinada molécula interagindo com um alvo biológico específico. Esta técnica computacional é usada também no campo da toxicologia aplicada para desenvolver modelos de classificação para a previsão do potencial desregulador endócrino de produtos químicos (MANZI *et al.* 2023; TRISCIUZZI *et al.*, 2018).

Interações moleculares podem ocorrer entre membranas, proteínas e moléculas de DNA, as quais são denominadas receptores, em contato com compostos químicos como contaminantes emergentes, drogas os quais são identificados como ligantes. Entretanto, é necessário que ocorra um ajuste induzido no qual, tanto os ligantes quanto os receptores precisam se adaptar, modificando a sua conformação, ou seja, adquirem uma estrutura mais estável com o intuito de diminuir a energia livre de ligação (TU *et al.*, 2021; FAN *et al.*, 2019)

Para realizar estes estudos é necessário seguir uma metodologia à fim de encontrar o melhor alvo macromolecular e o ligante que será utilizado (MANZI *et al.* 2023). Dessa forma, foi elaborado um diagrama com a metodologia utilizada nestes estudos (Figura 3).

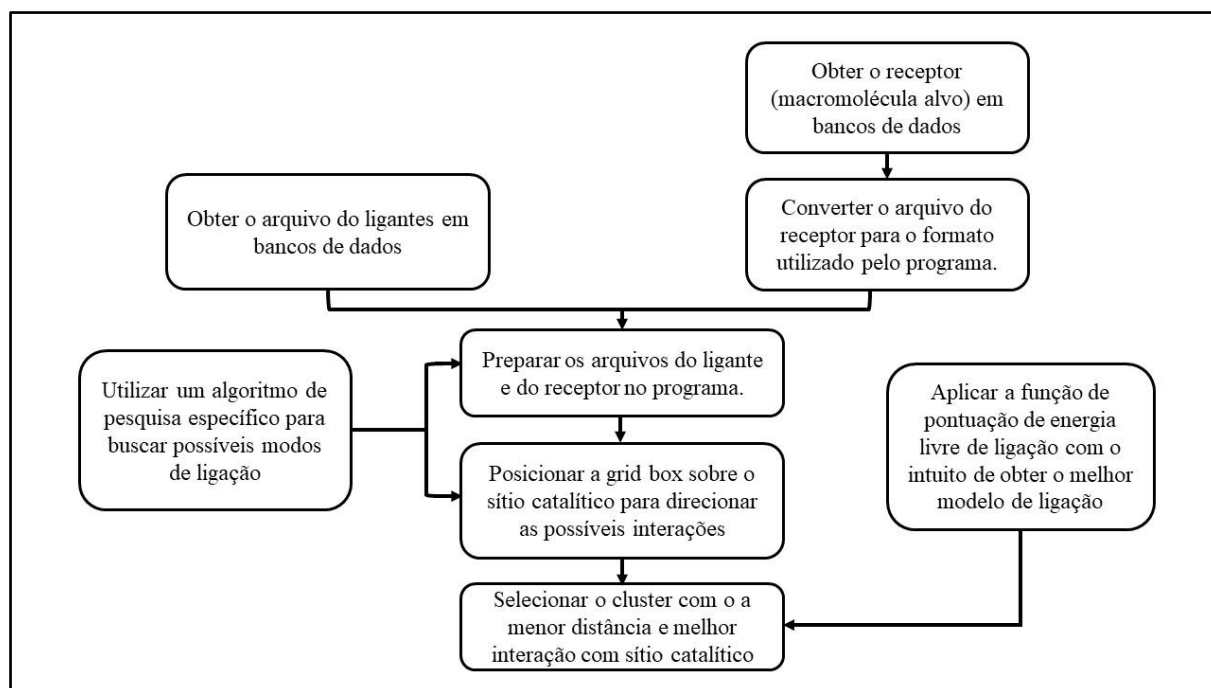


Figura 3: Diagrama sobre o processo de docking molecular. Para o desenvolvimento desta técnica é necessário seguir uma metodologia de obtenção do alvo e ligante, conversão do formato adequado para os programas, realizar a análise de docking e avaliar os resultados. Adaptado de FAN et al., 2019.

O docking molecular tem sido utilizado para aperfeiçoar a eficiência das pesquisas científicas voltadas à área clínica e experimental. No entanto esse método não substitui os ensaios pre-clínicos realizados com animais ou células. Estas análises contribuem para a redução dos custos de experimentos em laboratórios e também para pesquisa básica (LI *et al.*, 2013; GUEDES *et al.*, 2014; JAKHAR *et al.*, 2020).

1.10 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS

Enzimas são catalizadores eficientes e seletivos, com a capacidade de aumentar a velocidade de reações essenciais para os sistemas vivos. A grande maioria das reações bioquímicas são realizadas por enzimas, algumas catálises necessitam de coenzimas ou cofatores não proteicos para ocorrer. A energia de ligação é encarregada pela aceleração na velocidade das enzimas, a mesma energia que proporciona a catálise também promove a capacidade de distinção entre o substrato e as moléculas competidoras, conhecido como especificidade. A especificidade de uma enzima provém de muitas interações moleculares, consideradas fracas entre a enzima e o substrato (SCOTT *et al* 1990; RODUNER, 2014).

Ensaio enzimáticos utilizam a técnica de espectrofotometria, a qual permitem mensurar com precisão o resultado denominado produto do complexo enzima-substrato. Por meio da

mudança de cor e quantificação da absorvância ou transmitância é possível avaliar a quantidade de proteínas e também se há ou não inibição de uma certa enzima. Diferentes inibidores enzimáticos são utilizados para pesquisas sobre o desenvolvimento de novas drogas, efeitos nos sistemas biológicos e cinética enzimática (MUKHERJEE *et al.*, 1994; BACHMANN; MILLER, 2020).

As PLA2 são encontradas em vários organismos, incluindo bactérias, cnidários, mamíferos, peixes e plantas. Este grupo de enzimas é considerado fundamental devido o metabolismo de lipídeos e regeneração das membranas, além disso, estudos recentes evidenciam que a atividade da PLA2 pode ser considerada um novo biomarcador para avaliação da toxicidade em ambientes aquáticos. O monitoramento da atividade enzimática *in vivo* (esterases e fosfolipase A2) se mostrou um método com potencial para avaliar os efeitos adversos dos contaminantes em rotíferos sendo que estudos mostram que a inibição de esterases e PLA2 após exposição (30 min) às concentrações sub-letais de metais e pesticidas em condições laboratoriais são sensíveis às alterações induzidas pelos tóxicos (BURBANK; SNELL, 1994; RICO-MARTÍNEZ *et al.*, 2016).

Recentemente, dois genes *cpla2a* (*pla2g4aa* e *pla2g4ab*) foram identificados em zebrafish. O gene *cpla2a* está envolvido na síntese da prostaglandina no ovário em zebrafish. A presença de cPLA2 e seu papel no processo de desenvolvimento embrionário do zebrafish também foram reportados por Faber *et al.*, 1999, que conduziu os primeiros estudos sobre a cPLA2 em zebrafish (TANG *et al.*, 2017).

A mobilização de AA tanto em nível celular quanto na forma exógena envolveu a ação da enzima PLA2 citosólica e secretora associada às lipoproteínas, que juntamente com as reações do ciclo Land garantem a renovação contínua dos membros celulares e a reposição dos ácidos graxos poli-insaturados e intracelulares. A PLA2 citosólica desempenha um papel crucial, como ponte entre hormônios, estímulos inflamatórios, sinais de estresse fisiológico com mobilização de AA para mediar respostas fisiológicas ou adaptativas. Assim, essa classe de enzimas atrai considerável interesse farmacológico devido ao seu papel na sinalização lipídica e seu envolvimento em uma variedade de condições patológicas, devendo, portanto, ser estudada em diferentes grupos. No entanto, os papéis regulatórios das fosfolipases em patologias metabólicas ainda não foram totalmente elucidados, mas de fato existe uma relação entre a atividade dessas enzimas e a síndrome metabólica (MURAKAMI *et al.*, 2011; SATO *et al.*, 2016).

2 OBJETIVO

Avaliar a ação do inseticida malathion por meio de estudos teóricos com a fosfolipase A2 citosólica de peixes *Danio rerio*

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a homologia e desenvolver modelo tridimensional da cPLA2 e realizar análises de docking molecular com o modelo e o inseticida malathion e seus análogos.

Avaliar a inibição da atividade enzimática da PLA2 na presença do inseticida malathion por meio de experimentos *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DA ENZIMA MOLDE E ALVO

O primeiro passo para o desenvolvimento do modelo foi identificar a homologia entre a enzima cPLA2 de humanos (*Homo sapiens*), zebrafish (*Danio rerio*), coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e camundongo Swiss (*Mus musculus*) por meio do levantamento em bancos de dados como: RCSB Protein Data Bank, UNIPROT, entre outros. A busca por proteínas-moldes e alvo teve como objetivo principal correlacionar as sequências através de um algoritmo que visa encontrar a similaridade entre elas. Por meio da plataforma BLAST foram selecionadas as enzimas com similaridade maior que 30% (SANTOS-FILHO; ALENCASTRO 2003).

3.2 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DO MODELO

Após a seleção das proteínas alvo e molde, os dados foram transcritos para a ferramenta BLAST utilizando os bancos de dados do NCBI e Uniprot. Por meio desse processo, foi possível determinar as regiões conservadas e variáveis; as primeiras são estritamente similares e as posteriores encontram-se principalmente as alças, que são segmentos com resíduos de aminoácidos variáveis. Neste trabalho, foi utilizada a abordagem para construção do modelo por meio da análise de restrição espacial executada pelo software Modeller. Essa análise tem como característica principal utilizar parâmetros geométricos de qualidade levando em conta as restrições espaciais das estruturas proteicas (SALI; BLUNDELL, 1993; SALI; OVERINGTON 1994).

3.3 VALIDAÇÃO DO MODELO

Após o desenvolvimento do modelo, foi necessário identificar possíveis erros relacionados a seleção da estrutura alvo e molde. Nessa etapa foi utilizada a plataforma ProCheck para avaliação estereoquímica (Laskowski *et al.*, 1993). A respectiva plataforma verifica a qualidade estereoquímica da estrutura da proteína bem como a determinação dos ângulos torcionais da cadeia principal (Φ e Ψ) gerados pelo diagrama de Ramachandran. Por meio da plataforma PDBSum foram obtidas informações da estrutura secundária (folhas β e α -hélices) (ROMANELLO; KRICZINSKI, 2021).

3.4 DOCKING MOLECULAR

Os experimentos de docking foram realizados com a ferramenta AutoDock 4.2.6 (TROTT; OLSON, 2010). Como ligante foi avaliado o composto e malathion (inseticida) e seus metabólitos (MANZI *et al.* 2023). Os compostos analisados nos estudos de docking foram obtidos na plataforma PubChem e seus respectivos dados estão descritos na Tabela 1. Para as simulações foi utilizado como modelo molecular a enzima cPLA2 de *Danio rerio*.

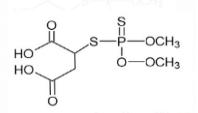
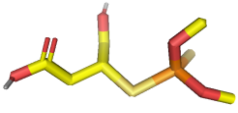
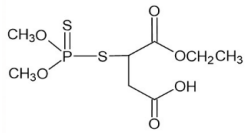
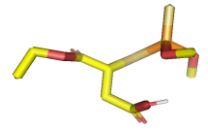
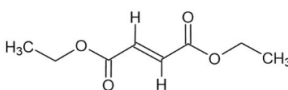
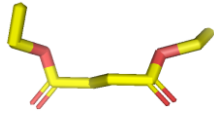
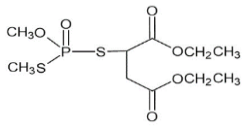
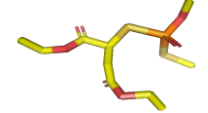
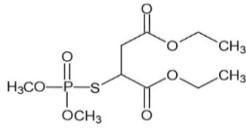
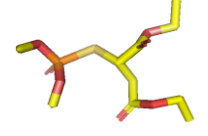
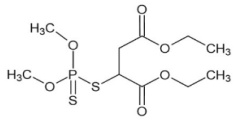
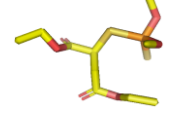
3.4.1 PREPARAÇÃO DOS ARQUIVOS DO LIGANTE E MOLÉCULA ALVO

Os ligantes foram obtidos na plataforma PubChem em formato 3D com a extensão .SDF. Após o download, os arquivos dos ligantes foram convertidos para o formato. Mol2. A preparação das coordenadas do modelo para os procedimentos de ancoragem efetuada utilizando a ferramenta Chimera 1.15 (PETTERSEN *et al.*, 2004). Em seguida, o program AutoDock 4.2.6 foi empregado para adicionar átomos de hidrogênio polares e agregar as cargas Kollman. Por fim, após todas as modificações, os arquivos foram convertidos com a extensão. PDBQT (TESKE, 2019). Para a análise *in silico* foi necessário executar os cálculos dos mapas de grade de energia (Grid Box) (SIRISHA *et al.*, 2018). O tamanho da grid box escolhido foi suficiente para envolver todos os resíduos de aminoácidos localizados no microambiente do sítio catalítico. As informações das coordenadas x, y e z foram salvas para uso posterior (GODÓI *et al.*, 2013; SIRISHA *et al.*, 2018).

3.4.2 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR

Os resultados foram avaliados utilizando as ferramentas Discovery studio (<https://www.3ds.com>), Ligplot (WALLACE *et al.*, 1995) e Pymol (YUAN *et al.*, 2017) com foco nas energias de ligação de Gibbs, distâncias entre átomos e orientações das moléculas no microambiente do sítio ativo da proteína cPLA2 de *Danio rerio*.

Tabela 1 - Descrições sobre o inseticida malathion e seus análogos apreciados nos experimentos de docking molecular com a proteína cPLA2 de *Danio rerio*.

Nome do composto	Código PubChem	Fórmula	Estrutura	Formato 3D
Ácido dicarboxílico	CID: 14481	$C_6H_{11}O_6PS_2$		
Ácido monocarboxílico	CID: 3032927	$C_8H_{15}O_6PS_2$		
Dietil fumarato	CID: 638144	$C_8H_{12}O_4$		
Isomalathion	CID: 91529	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$		
Malaóxon	CID: 15415	$C_{10}H_{19}O_7PS$		
Malathion	CID: 4004	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$		

3.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFOLIPASE A2

3.5.1 CULTIVO E MANEJO DOS ORGANISMOS

O presente trabalho foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências do CLP e aprovado sob o protocolo n° 09/2022. Os peixes da espécie *Devario malabaricus* foram obtidos em loja de aquarismo e após a aclimação, mantidos em

aquários com água isenta de cloro com pH neutro (7,2) e temperatura média de 25°C, sistema de aeração e filtração UV, e fotoperíodo natural de 12h. Cumprindo um período de quarentena por 15 dias, o manejo dos organismos foi realizado de acordo com os procedimentos e orientações da Associação Brasileira de Normas Técnicas e Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (ABNT 2004; DAMMSKI *et al.*, 2011; OECD, 2013; BRASIL, 2023).

3.5.2 TESTE DE EXPOSIÇÃO AO MALATHION IN VIVO

Os testes de determinação da CL50 (concentração letal 50%) em 24h foram conduzidos no Laboratório BIOMOLPEP na UNESP-CLP. Para os testes, foi utilizado o inseticida malathion Dimmy (Dimethyson, composição 5% p/p de Malathion e 95% p/p de solventes). Adultos do peixe *Devarius*, adquiridos comercialmente, foram aclimatados por 15 dias em tanques de 50L.

Para o cálculo da CL50, foram utilizados o método de Probits (FINEY, 1971) e regressão linear no programa Excel. Os valores de porcentagem de mortalidade (%) foram substituídos por valores tabelados e uma análise de regressão linear foi realizada para determinar o coeficiente de regressão (b) e intercepto (a). Por fim, a determinação da CL50 foi realizada por meio da equação ($y=ax+b$).

Para o experimento, os peixes foram mantidos em quarentena de 24 horas, separados em grupos de 5 e acondicionados em recipientes com 3 litros de água potável. Todos os recipientes continham sistema de aeração durante todo o período do experimento. Os cálculos foram realizados de acordo com a concentração inicial do inseticida e o volume total de água utilizado em cada tratamento a partir de uma solução estoque.

No total foram elaboradas cinco concentrações em duplicatas, sendo um controle (0 %) e os demais tratamentos com 0,01, 0,02, 0,03 e 0,04 % da solução.

3.5.3 EXPERIMENTOS BIOQUÍMICOS

Após 24 horas de exposição os peixes que sobreviveram foram eutanasiados em gelo para encerrar o sofrimento dos animais. Após a eutanásia, foi utilizado nitrogênio líquido para congelar os organismos individualmente, em seguida foram armazenados em -80°C.

As amostras foram processadas com o auxílio de almofariz e pistilo e acondicionadas em tubos falcon, em seguida, agitadas em vórtex e levadas ao banho ultrassônico por 5 minutos para homogeneização e depois, centrifugadas por 10 min a 4°C a 13.000 rpm.

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 425 nm para determinação de conteúdo de proteínas pelo método de Bradford (KRUGER, 2019). Para determinação da atividade enzimática, o extrato bruto contendo PLA2 foi solubilizado com solução salina a 9% e submetido a banho de ultrassom.

A solução com concentração de malathion comercial 0,5% (p/v) (Dymethison, Brasil) foi diluída em água ultrapura até atingir o limite permitido para águas superficiais brasileiras de acordo com a legislação (CONAMA 357/2005).

O substrato utilizado foi ácido 4-nitro-3-octanoiloxibenzóico (NOBA) (PubChem ID: 20112083), diluído em uma concentração (2mg / mL) com acetonitrila (100%) e submetido a banho ultrassônico.

O extrato bruto de PLA2 de peixe teve a concentração ajustada para 1 mg/mL por análise de concentração de proteína (Bradford), posteriormente, em microplaca de 96 poços (ELISA), as soluções foram pipetadas sendo adicionado ao extrato bruto de PLA2: tampão (175 µL Tris-HCL), 50 µL de solução salina e antes da incubação, 25 µL de NOBA. O substrato foi adicionado após a incubação por 20 minutos em local escuro. As amostras foram analisadas em um espectrofotômetro UV-VIS a 405 nm SPECTRA MAX (Molecular Devices, CA) durante 60 minutos (Pires *et al.* 2013). Os resultados foram expressos como as médias $\pm$ SEM e as diferenças entre as médias por ANOVA com auxílio do software GraphPad Prism (SCHWAIGER *et al.*, 2004).

4. RESULTADOS

4.1 ALINHAMENTOS DAS SEQUÊNCIAS

A sequência de resíduos da proteína cPLA2 (UNIPROT: P50392) de zebrafish foi comparada com as sequências de outras espécies como humanos (taxid: 9606), coelhos (taxid: 9986) e roedores (taxid:9823). As sequências apresentaram valor de identidade superior a 70%, e-value 0.0 e cobertura de 98%. Com a finalidade de demonstrar o resultado do alinhamento, foram analisadas as sequências FASTA das proteínas na plataforma BLAST e o resultado do alinhamento está representado na Figura 4.

zebrafish	-----MSNIIIVEHQYSHRLKLTWVRAENVTKGAFGDLDTDPDYVELSVPTTPESRKRT	54
humanos	MSFIDPYQHIIVEHQYSHKFTVWVLRATKVTKGAFGDMDLTDPDYVELFISTTPDSRKRT	60
coelhos	MSFIDPYQHIIVEHQYSHKFTVWVLRATKVTKGAFGDMDLTDPDYVELFIATTPDSRKRT	60
roedores	MSFIDPYQHIIVEHQYSHKFTVWVLRATKVTKGTFGDMDLTDPDYVELFISTTPDSRKRT	60
	:*****:::.*:* :***:***:***** : **:*	
zebrafish	RHINNDINPKWNETFEFILDNPQSNVLEVTLMANYVMDLGTAKYSLSKLKVAQMEHV	114
humanos	RHFNNDINPVWNETFEFILDNPQENVLEITLMANYVMDLGTATFTVSSMKVGEKKEV	120
coelhos	RHFNNDINPVWNEAFEFILDNPQGNVLEITLMANYVMDLGTATFPVSSMKVGEKKEV	120
roedores	RHFNNDINPVWNETFEFILDNPQENVLEITLMANYVMDLGTATFPVSSMKVGEKKEV	120
	:** ***:***** ****:*****::: :*:**:: :*	
zebrafish	TLSIGKTTKVFLLDLLEVCASDTRFSMTLCDQEKLFMQTRDRVMSLSIKLLKMNPRF	174
humanos	PFIFNQVTEMLVMSLEVCSPDLRFMSALCDQEKTRFQQRKEHIRESMKLLGPKNSEG	180
coelhos	PFIFNQVTEMLEMSLEVCSSPDLRFMSALCDQEKAFRQQRKENIKENMRKLLGPKKSEG	180
roedores	PFIFNQVTEMLEMSLEVCSPDLRFMSALCDQEKTRFQQRKENIKENMKLLGPKKSEG	180
	: :*:**::: :****: *****:***** * * *: : : : :*** : :	
zebrafish	LPSSPREVPTIAILGSGGGFRAMVGFSGVMKALYESGVFDCATYVAGLSGSTWYMSMLYS	234
humanos	L-HSARDVPVAILGSGGGFRAMVGFSGVMKALYESGILDCATYVAGLSGSTWYMSTLYS	239
coelhos	L-YSTRDVPVAILGSGGGFRAMVGFSGVMKALYESGILDCATYIAGLSGSTWYMSTLYS	239
roedores	L-YSTRDVPVAILGSGGGFRAMVGFSGVMKALYESGILDCATYIAGLSGSTWYMSTLYS	239
	* * *:**:::*****:*****:*****:*****:*****:***** *	
zebrafish	HPEFPAKGPGDINKELMNRVSNPLKLLLPQINRYVKALWKKKSAGQPVTFDIFGMLI	294
humanos	HPDFPEKGPEEINEELMKNVSHNPLLLLPQKVKRYVESLWKKKSAGQPVTFDIFGMLI	299
coelhos	HPDFPEKGPEEINEELMKNVSHNPLLLLPQKVKRYVESLWKKKSAGQPVTFDIFGMLI	299
roedores	HPDFPEKGPEEINEELMKNVSHNPLLLLPQKVKRYVESLWKKKSAGQPVTFDIFGMLI	299
	: ***:**:::***:*** ***:**:::***:***:*****:*****:*****	
zebrafish	GETLIPGRMNILSSSLKGKINEGQSPPLPFTCLHVKPDVSELMFADWVEFSPYEIGMAKY	354
humanos	GETLIHNRMTTLSSSLKEKVNTAQCPPLPFTCLHVKPDVSELMFADWVEFSPYEIGMAKY	359
coelhos	GETLIHNRMTTLSSSLKEKVNTAQCPPLPFTCLHVKPDVSELMFADWVEFSPYEIGMAKY	359
roedores	GETLIQNRMSMTLSSSLKEKVNAARCPPLPFTCLHVKPDVSELMFADWVEFSPYEIGMAKY	359
	*****.** :******:**:::*****:*****:*****:*****:*****	
zebrafish	GTFMSPGLFGSKFFMGVSVKQYEEENPLHFLMGVWGSAFSILFNRVLGVKETT--SSSTME	413
humanos	GTFMAPDLFGSKFFMGTVVKYEEENPLHFLMGVWGSAFSILFNRVLGVSGSQSGSTME	419
coelhos	GTFMAPDLFGSKFFMGTVVKYEEENPLHFLMGVWGSAFSILFNRVLGVSGSHKSGSTME	419
roedores	GTFMAPDLFGSKFFMGTVVKYEEENPLHFLMGVWGSAFSILFNRVLGVSGSQNGSTME	419
	*****:*.*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
zebrafish	ELEQIKPEHIVGDDSDADNEEET-QRGGTESADAEDERQHAQASWQRMILTSIMGDTTLF	472
humanos	ELENITTKHIVSNDSSDSDDESHEPKGTENEDAGSDYQSDNQASWIHRMIMALVSDSALF	479
coelhos	ELENITAKHIVSNDSSDSDDESQEPKGTEGEDAEREYQNDHQASWVHRMIMALVSDSALF	479
roedores	ELENITAKHIVSNDSSDSDDEAQGPKGTENEEAEKEYQSDNQASWVHRMIMALVSDSALF	479
	:*. ::***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
zebrafish	TREGRAGKVHNFMLGLNLNSTLPSPFSGITHQTSLEEE--VDAVTPDEFERIEYPLD	530
humanos	NREGRAGKVHNFMLGLNLNSTYPLSPLSDFATQDSFDDDELDAVADPDEFERIEYPLD	539
coelhos	NREGRAGKVHNFMLGLNLNSTYPLSPLRDF--QESFDDDELDAVADPDEFERIEYPLD	538
roedores	NREGRAGKVHNFMLGLNLNSTYPLSPLRDFS--SQDSFDDDELDAVADPDEFERIEYPLD	538
	.*****:*****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
zebrafish	VKSKKIHVDSGLTFNLPLYLILRCQRGVDLIISFDFSARPSDSSPPFKELLAEKWARM	590
humanos	VKSKKIHVDSGLTFNLPLYLILRPQRGVDLIISFDFSARPSDSSPPFKELLAEKWAKM	599
coelhos	VKSKKIHVDSGLTFNLPLYLILRPQRGVDLIISFDFSARPSDSSPPFKELLAEKWAKM	598
roedores	VKSKKIHVDSGLTFNLPLYLILRPQRGVDLIISFDFSARPSDSSPPFKELLAEKWAKM	598
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

Figura 4: Representação do alinhamento múltiplo entre as sequências das proteínas cPLA2 de

zebrafish, humanos, coelhos e roedores. Legenda: (*) similaridade; (:) divergência e os espaços em branco são GAPS. Fonte: Do autor.

4.2 CONSTRUÇÃO DO MODELO

Foram criados um total de 25 modelos para a proteína (cPLA2) utilizando a ferramenta Modeller versão 10.1 e selecionados de acordo com o menor número de DOPE score. O modelo definido foi então reproduzido no software Pymol e a representação em 3D está ilustrada na Figura 5.

4.3 VALIDAÇÃO

A etapa de validação foi realizada na plataforma Molprobity onde foi necessário fazer upload dos modelos analisados no formato .PDB e adicionar cargas de hidrogênio para refinamento das estruturas. Em seguida foram gerados os gráficos de Ramachandran para determinar a qualidade dos modelos. O modelo selecionado para a proteína cPLA2 demonstrou boa qualidade com Z-score de 0.04 +/- 0.30, além de 93.49% dos aminoácidos em regiões favoráveis representados no gráfico de Rhamachandran, expressado na Figura 5. Quanto à estrutura secundária, a cPLA2 possui 709 resíduos de aminoácidos composta com 35% por α -hélice, 17% com folhas- β e regiões de alças 48%.

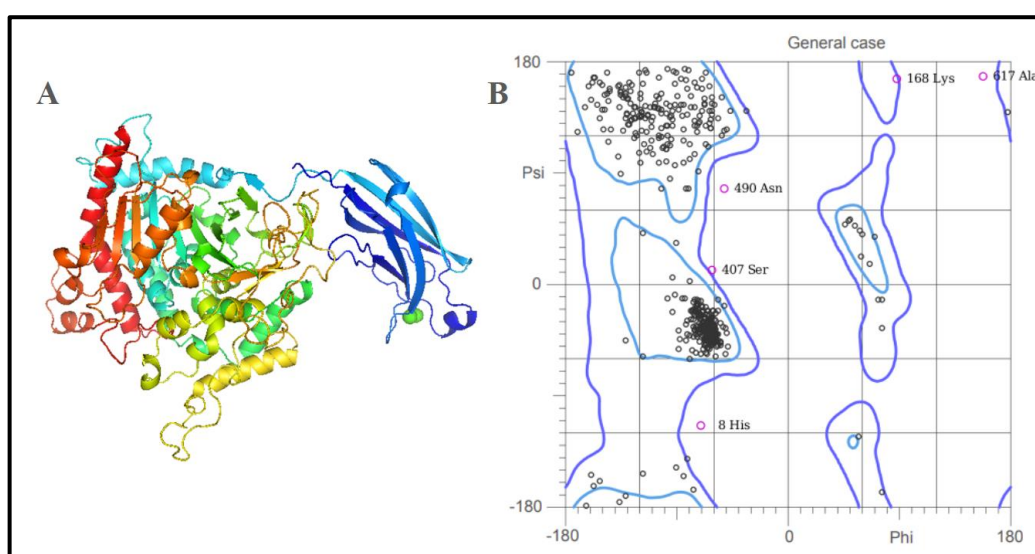


Figura 5: Imagem 3D do modelo da proteína cPLA2 de zebrafish desenvolvido no software Modeller e reproduzido no Pymol. Gráfico de Ramachandran da proteína cPLA2 de zebrafish para validação do modelo, desenvolvido na plataforma Procheck.

4.4 DOCKING MOLECULAR

O experimento de docking molecular foi realizado no programa AutoDock 4.2.6 para as fosfolipases A2 citosólica de *Danio rerio* com o MLT e seus derivados. A seguir, estão os resultados desenvolvidos e analisados nos softwares Pymol version 2.4.1, Discovery Studio 2021 e LigPlot⁺ v.2.2.4 e assim cada uma das proteínas com os ligantes foram examinados individualmente.

A cPLA2 de *Danio rerio* apresenta em seu sítio catalítico os resíduos de aminoácido Ser 223 e Asp 540. O Grid Box foi elaborado de acordo com Sirisha et al. (2018) utilizando o software AutoDock 4.2.6, com um tamanho adequado para que encobrisse totalmente a região de catálise da proteína. Com as seguintes coordenadas X=48.99; Y=-5.26; Z=58.92. Para selecionar as melhores interações proteína-ligante, foi utilizado como indicativo de alta afinidade os dados de energia livre de Gibbs (ΔG), o desvio quadrático médio (RMSD).

O ácido dicarboxílico apresentou uma distância média de 2,99 angstroms (Å) entre as ligações moleculares e energia livre de ligação de -5.5 Kcal/mol. Com quatorze interações de van der Waals e dentre estas está o resíduo de aminoácido do sítio catalítico Asp 540; o outro resíduo da díade catalítica a Ser 223 apresentou uma ligação de hidrogênio. Também tiveram duas ligações de hidrogênio com a Asn 546. O resíduo Glu 412 conteve dois tipos de interação, uma ligação de carbono hidrogênio e outra de atração de cargas com o fósforo da molécula analisada. E por fim, o resíduo Gly 192 revelou uma interação desfavorável entre doador-doador.

O composto ácido monocarboxílico apresentou uma distância média de 3,13 Å entre as ligações intermoleculares da proteína cPLA2 e energia livre de ligação de -5.2 Kcal/mol. Demonstrou 14 interações de van der Waals, incluindo o resíduo de aminoácido do sítio catalítico Ser 223. Duas ligações de hidrogênio com os resíduos Asn 546 e Ala 569, além de duas ligações covalentes do tipo Alquil com a Ala 391 e Met 411 e uma ligação covalente carbono hidrogênio com o resíduo Ser 568.

O dietil fumarato teve distância média de 3,12 Å nas interações moleculares com a proteína e energia livre de ligação de -5.0 Kcal/mol. Um total de 9 interações de van der Waals, incluindo os resíduos do sítio catalítico Ser 223 e Asp 540. Duas ligações do tipo Alquil com a Ala 391 e Met 411. Além de uma ligação entre carbono hidrogênio com o resíduo Ser 568.

O isomalathion apresentou uma distância média de 3,13 angstroms nas interações moleculares e energia livre de ligação de -5.4 Kcal/mol. Um total de 8 interações de van de

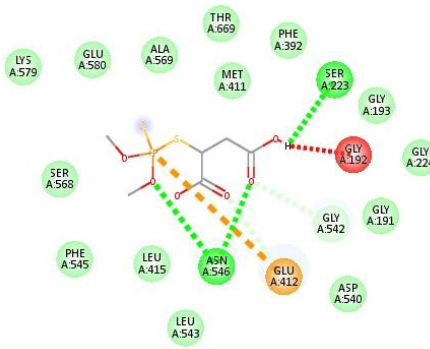
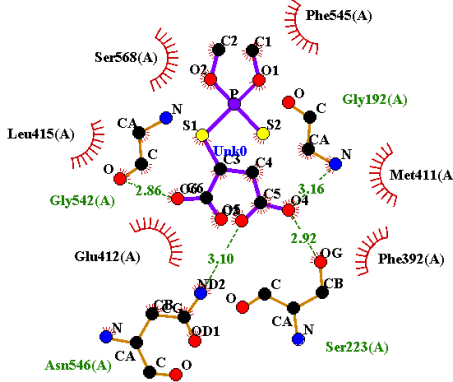
Waals foram identificadas, incluindo o resíduo do sítio catalítico Ser 223. Também foi constatado uma ligação de hidrogênio com a Ala 569, duas ligações de carbono hidrogênio com os resíduos Glu 412 e Ser 568, além de duas interligações do tipo Alquil com a Met 411 e Lys 579.

O malaóxon apresentou uma distância média de 3,15 Å nas interações moleculares com a proteínas e energia livre de ligação de -5.6 Kcal/mol. Contendo nove interações de van der Waals, duas ligações de hidrogênio com os resíduos Asn 546 e Ala 569. Ligações de carbono hidrogênio também ocorreram entre os resíduos Glu 412, Asn 546, Ser 568 e Phe 545. O resíduo Glu 412 também apresentou uma interação por atração de cargas com o átomo de fósforo da molécula. E interações do tipo Alquil foram detectados entre os resíduos Lys 579 e Leu 583.

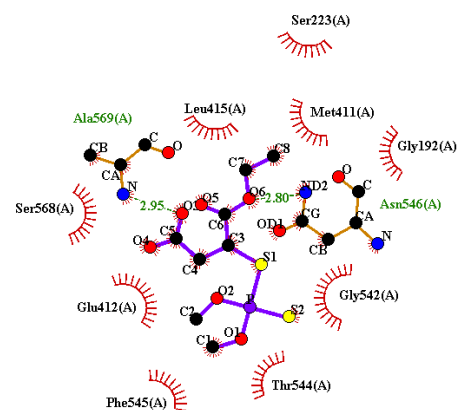
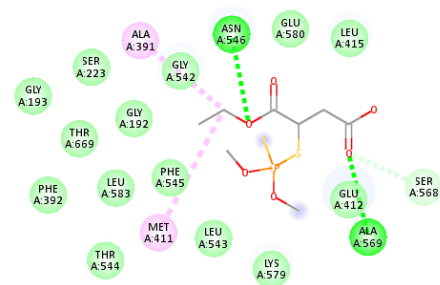
Em relação às interações moleculares do malathion, este apresentou uma distância média de 3,18 Å e energia livre de ligação de -5.4 Kcal/mol. Com nove ligações de van de Waals, incluindo os resíduos do sítio catalítico Ser 223 e Asp 540. Interações do tipo Alquil também foi encontrada entre a Ala 391, Met 411 e Leu 415. Além de ligações de carbono e hidrogênio com os resíduos Thr 544 e Ser 568. Os dados de todas as interações estão representados na Tabela 2.

Os ligantes malathion, isomalathion e o malaóxon são os mais comuns na literatura e o resultado das interações com a proteína cPLA2 estão descritos estão na figura 6, com destaque para a região do bolsão catalítico onde é possível observar os três ligantes supracitados, com ênfase para o malathion e os resíduos do sítio catalítico.

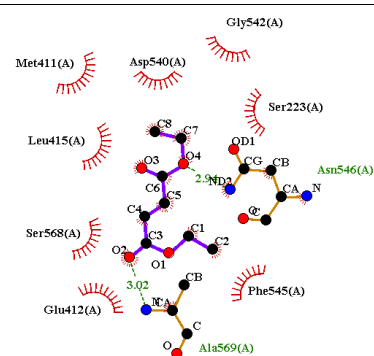
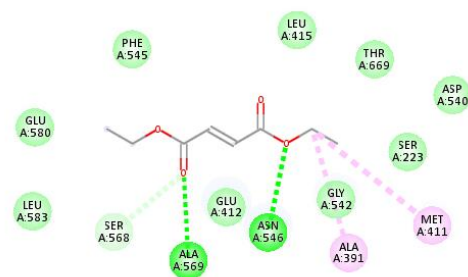
Tabela 2: Interações moleculares da proteína cPLA2 de zebrafish com o malathion e seus análogos, analisadas nos softwares Discovery e LigPlot⁺

LIGANTES	DISCOVERY	LIGPLOT
Ácido Dicarboxílico		

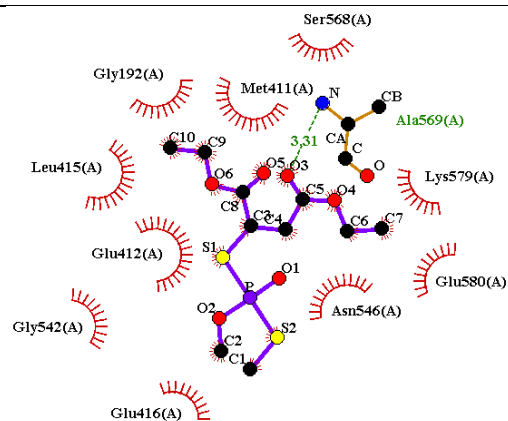
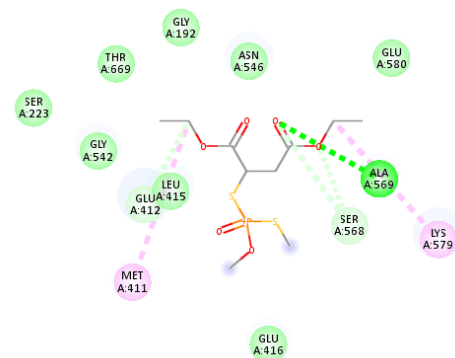
Ácido Monocarboxílico



Dietil Fumarato

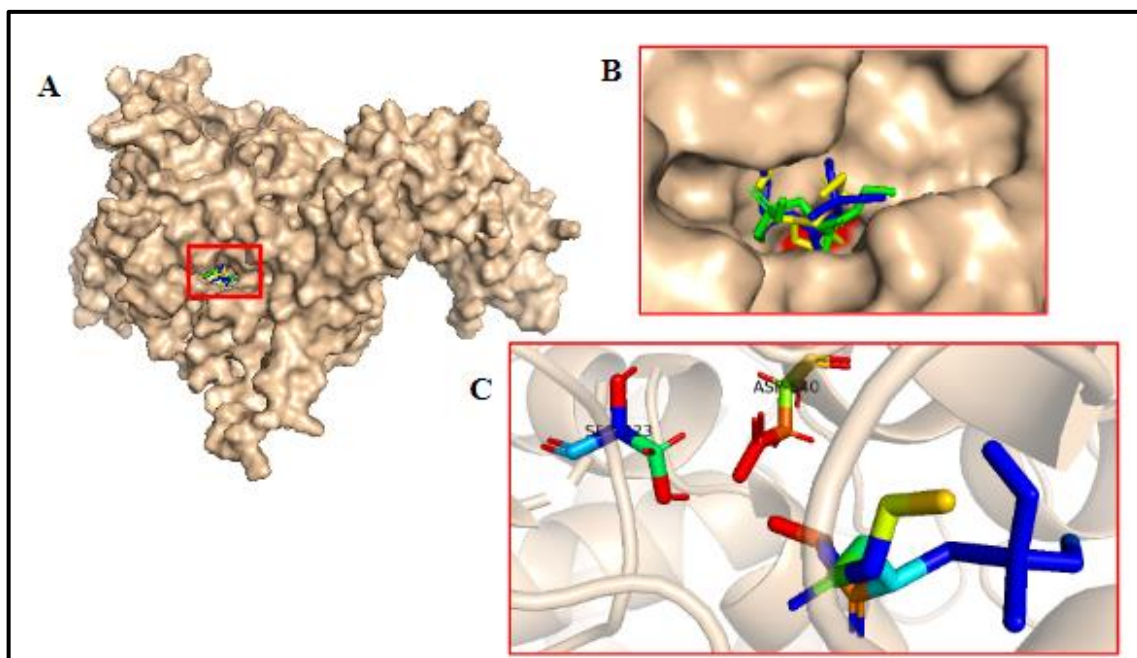


Isomalathion



Malaöxon

Malathion



33

4.5 EXPOSIÇÃO AO MALATHION

A exposição dos peixes ao MLT resultou em mortalidade total dos espécimes a partir da concentração de 0,03 % (100%). Desse modo, verificou-se a sobrevivência de todos os organismos testes nas concentrações 0; 0,01 e 0,02 % (Tabela 3). Dessa forma, a concentração letal do MLT para *Devorio malabaricus* é de 0,029% de acordo com o método de Probits. Os resultados da CL50 estão demonstrados na figura 7.

Tabela 3: Resultados do experimento *in vivo* dos peixes expostos ao malathion em diferentes concentrações.

Concentração	Total (n)	Sobreviventes	Mortos
0 µL	10	10	0
0,01 µL	10	10	0
0,02 µL	10	10	0
0,03 µL	10	0	10
0,04 µL	10	0	10

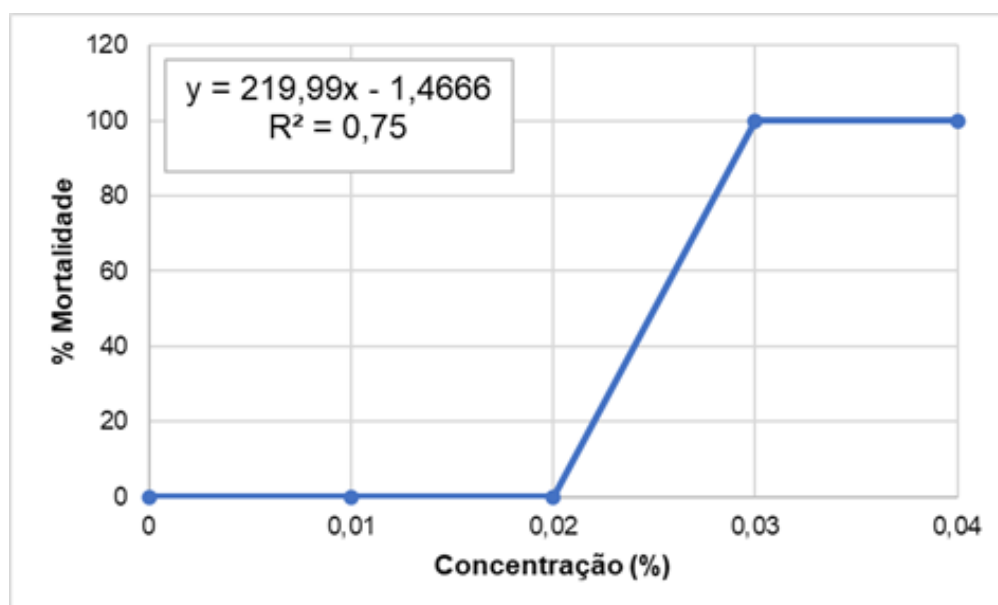


Figura 7: Demonstração do gráfico referente ao cálculo da CL50 de acordo com o método de Probits e regressão linear desenvolvidos no programa Excel. Determinado por meio da equação ($y=ax+b$).

4.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFOLIPASE A2

Os resultados do ensaio de inibição da atividade enzimática da fosfolipase A2 estão demonstrados na Figura 8. Pode-se observar inibição da enzima fosfolipase A2 na concentração de 0,02 e 1 % de MLT confirmado pelo teste estatístico ANOVA ($F = 18,86$; $p < 0,01$).

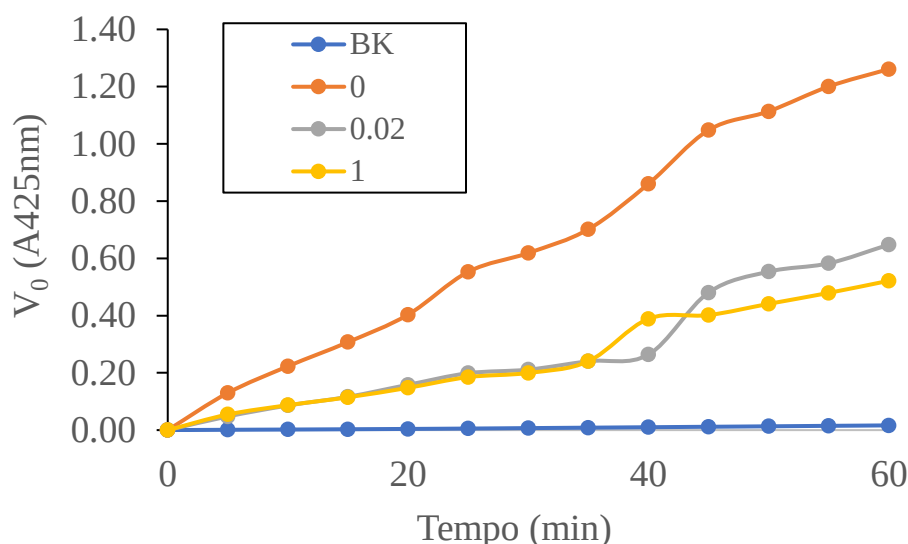


Figura 8: Atividade enzimática da fosfolipase A2 de *Devario malabaricus* contra o inseticida malathion.

5. DISCUSSÃO

Estudos *in silico* atualmente são utilizados para prever interações entre proteínas e diversos ligantes. No presente estudo, foi criado modelo tridimensional de fosfolipases A2 citosólica de zebrafish, os quais foram testados com o malathion e seus análogos.

Os modelos desenvolvidos foram embasados na similaridade das sequências com identidade superior a 70% utilizando técnicas de bioinformática, em seguida foram validados com a construção dos gráficos de Ramachandran utilizando o programa Procheck. Os resultados desse estudo demonstraram mais de 90% de resíduos de aminoácidos situados em regiões favoráveis do modelo (HAGEN, 2000; SANTOS-FILHO *et al.*, 2001; DE ARAÚJO *et al.*, 2008; CALIXTO *et al.*, 2013). Considerando que o sítio ativo das proteínas moldes assemelham-se com os modelos desenvolvidos como pode ser visto no alinhamento de sequências, pode-se inferir que os efeitos podem ser semelhantes, considerando humanos e outros animais. Em uma pesquisa similar exceto pelo tipo de ligante, que no caso foram contaminantes como furanos e benzopirenos, foi possível notar que os receptores celulares a base de proteínas

pode constituir afinidade com esses compostos e causar efeitos negativos à nível celular e molecular (WU *et al.*, 2009; XIAOLIM *et al.*, 2012).

Ainda é pouco estudada a relação da fosfolipase A2 com inseticidas e seus metabólitos. Verifica-se uma lacuna na bibliografia acerca da interação entre o sítio ativo da proteína e organofosforados. A grande maioria das pesquisas está relacionada com a enzima acetilcolinesterase (AChE) de peixes e a inibição por malathion, bem como as consequências do acúmulo de acetilcolina.

No geral, os resultados deste estudo demonstraram que os átomos dos ligantes estiveram associados por meio de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e covalentes (alquil). Para os ácidos mono e dicarboxílico, o sítio catalítico das duas proteínas interagiram por meio da força de van der Waals e ligação de hidrogênio (Ser 223). Uma das hipóteses aventadas sobre a possível interação com o malathion e seus derivados é que a PLA2 tem comportamento semelhante a AChE, também uma hidrolase (CALIC *et al.*, 2006).

Essa hipótese é sustentada por um trabalho conduzido por KRYSAN e GUSS (1971), onde foi verificada a inibição da lipase de ovos de inseto por organofosforados. O malathion e seus metabólitos inibem a atividade enzimática através do processo de fosforilação do resíduo de aminoácido serina. No caso da AChE o resultado é a acumulação de acetilcolina e hiperestimulação do sistema colinérgico que inclui efeitos neuromusculares e no sistema nervoso (COLOVIC *et al.*, 2013; REED; RUBIN, 2014; KING; AARON, 2015; SLOTKIN, 2004).

A ligação do malathion a outros tipos de lipases pode ser um meio de hidrolisar o organofosforado, como observado em ROSENBAUM *et al.* (1988) em testes *in vivo*, proporcionado assim, a redução da concentração livre desse inseticida. No entanto, o fato do malathion interagir com o sítio catalítico das proteínas, pode promover a interação com os fosfolipídios de membrana e o ciclo da remodelação da mesma causando um desequilíbrio nos níveis do AA e lisofosfolipídios (PAF), substratos fundamentais para as fosfolipases.

Pesticidas como o malathion exercem seus efeitos tóxicos, principalmente no sistema nervoso pela atuação de diversos mecanismos de homeostase do Ca^{2+} . A ativação da cPLA2 envolve processos pós-traducionais com o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, fosforilação por proteína-quinase específica de serina e treonina (MAPK) e ficotoxinas (ácido ocadaico). A fosforilação por MAPKs nos resíduos de serina 505 e 727 localizados no domínio catalítico, promove a otimização da atividade enzimática (CLARK *et al.*, 1995; EPSTEIN *et al.*, 2009; KOKOTOU *et al.*, 2017).

O controle da regulação da enzima é complexa e envolve mecanismos de alteração dos níveis de Ca^{2+} intracelular. O aumento da concentração deste íon é capaz de ativar a enzima e promover a translocação do citoplasma para a região de membrana do retículo endoplasmático, onde ligam-se dois íons de Ca^{2+} na face de ligação do domínio C2. Esta ligação proporciona um aumento da hidrofobicidade da região, permite a translocação e garante a estabilidade da proteína à membrana (LESLIE, 2015).

Dessa forma, o domínio catalítico que é independente de Ca^{2+} alcança a região da membrana e se liga com o auxílio do resíduo de Trp 464, o qual é responsável por estabelecer este vínculo. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} promove o deslocamento da enzima do retículo endoplasmático para a região de membrana do envelope nuclear. Onde novamente a face de ligação de Ca^{2+} se liga à membrana, o resíduo Trp 464 estabiliza a enzima e o sítio catalítico é ativado promovendo a clivagem dos fosfolipídios (GIJON *et al.*, 1999; LESLIE, 2015; SIRIANANT *et al.*, 2016).

Agentes organofosforados apresentam moderada toxicidade e são comumente referidos como agentes nebulizadores e usado como arma química em guerras. A interação com enzimas PLA2 do grupo VII, por exemplo, pode ser interessante para explorar a reatividade de organofosforados, pois está presente no sangue e células de vertebrados, caminho por onde os agentes nervosos percorrem até seu alvo final na sinapse nervosa, sob o paradigma dos sequestradores catalíticos (ROSENBAUM *et al.*, 1988; ROBERTS; AARON, 2007; SAMANTA *et al.*, 2009; EPSTEIN *et al.*, 2009).

Em pesquisas sobre a interação de pesticidas e eicosanóides, esse último um mediador lipídico derivado da reação enzimática da PLA2, observam-se que o efeito inibidor de prostaglandinas D2 (PGD2) podem surgir da inibição de múltiplos elementos da cascata AA, incluindo fosfolipase A2, enzimas COX que produzem prostaglandinas H2 (PGH2), e as reações a jusante que convertem PGH2 em PGD2 (MEVES, 2008; KUGATHAS *et al.*, 2016; TALLIMA; EL RIDI, 2018).

A observação desses autores mostra que a suplementação de AA falhou em resgatar os efeitos de inibição de PGD2 o que sugere que o mecanismo de ação pode ser reduzido à inibição de COX e/ou a eventos a jusante envolvendo a conversão de PGH2 em PGD2. A inibição da síntese de PGD2 também pode ser uma consequência da regulação negativa da expressão da enzima COX, mas esta possibilidade não foi demonstrada na literatura. Em relação às isoformas de ciclooxygenases, WALKER e MCELDOWNEY (2013) demonstraram que a COX2 de peixes (trutas), cladoceros (*Daphnias*) e anfíbios (*Xenopus*) se liga à anti-inflamatórios e

também hormônios presentes na água. Esses autores utilizaram métodos *in silico* e corroboraram os resultados teóricos com pesquisas experimentais provenientes da literatura (MARKWORTH; CAMERON-SMITH, 2013; RICO-MARTÍNEZ *et al.*, 2016).

Na pesquisa realizada por ARIAS-ALMEIDA e RICO-MARTÍNEZ (2011), foi verificado a inibição em 50% da enzima PLA2 em concentrações traço de DDT (0.96×10^{-6} µg/L) e mais elevadas para metil parathion (69 µg/L). O uso de biomarcadores moleculares como as esterases e PLA2 demonstrou ter maior sensibilidade a outros testes padronizados que usam como “endpoint” a mortalidade por exemplo (BURBANK; SNELL, 1994) com sensibilidade 22 vezes maior do que testes de toxicologia agudos típicos (PÉREZ-LEGASPI; RICO-MARTÍNEZ, 2003; MANGAS *et al.*, 2017).

Por outro lado, pesquisas identificaram uma estimulação da atividade enzimática de fosfolipases incubadas com malathion, o que pode estar relacionada à associação da enzima com componentes da membrana hidrolisada como a fosfoetanolamina e fosfatidilcolina. Num estudo com pesticidas organoclorados, verifica-se que devido às alterações do meio, na interação lipídio-proteína bem como associação entre o pesticida e a membrana, as fosfolipases não exercem sua atividade catalítica (DESCHROEDER; DEDANGELO, 1995).

Neste trabalho, os peixes foram expostos à diferentes concentrações de malathion por 24 horas. A concentração letal de malathion para *Devario malabaricus* realizada neste trabalho foi de 0,029%. De acordo com a classificação de Zucher (1985) para organismos aquáticos, o malathion se apresenta como extremamente tóxico. De Souza *et al.* (2015) analisou diferentes concentrações de malathion em testes não estáticos de toxicidade aguda em peixes da espécie *Colossoma macropomum* com exposição de até 96 horas e a CL50 foi de 15.77 mgL⁻¹. A concentração letal demonstrada no presente trabalho foi inferior, entretanto, o modelo animal que foi utilizado para análise apresenta tamanho corporal inferior.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da escassez de dados sobre PLA2 em peixes foi possível construir modelos realísticos que permitiram a elucidação das proteínas como a região do sítio ativo bem como as estruturas secundárias. A partir dos resultados de docking molecular, foi possível observar que o malathion e seus análogos interagem com a região catalítica da proteína cPLA2 e seus respectivos resíduos de aminoácidos. O ácido dicarboxílico e monocarboxílico, metabólitos do malathion foram os principais ligantes devido as ligações de hidrogênio com o sítio catalítico.

Apesar de ser considerada uma ferramenta importante para estudos moleculares, as análises *in silico* são apenas previsões sobre possíveis interações moleculares entre as proteínas e os ligantes.

Em relação à avaliação da atividade enzimática, o presente trabalho apresenta resultados de uma inibição significativa da atividade da fosfolipase A2. Para o experimento, foi utilizado o extrato homogeneizado do tecido corpóreo dos organismos que foram expostos à diferentes concentrações *in vivo* ao malathion.

Para melhor entendimento quanto ao tipo específico de PLA2 encontrada em diferentes órgãos e tecidos do peixe *Devario malabaricus*. Portanto, recomenda-se que seja realizado o isolamento da proteína em diferentes tecidos para especificar qual o tipo de fosfolipase está atuando no processo.

REFERÊNCIAS

- AAEN, B.; JESSEN, F.; JENSEN, B. 1995. Partial purification and characterization of a cellular acidic phospholipase A2 from cod (*Gadus morhua*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 110, n. 3, p. 547-554, 1995.
- ABOU EL ELLA, Salwa. Toxicity of malathion and its effect on the activity of acetylcholinesterase in various tissues of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* Val. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, v. 12, n. 2, p. 109-117, 2008.
- ABDOLLAHI, Mohammad et al. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, v. 10, n. 6, p. RA141-RA147, 2004.
- ABNT, Normas. ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas. Rio de Janeiro, 2004.
- ABOU-DONIA, Mohamed B. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, v. 58, n. 8, p. 484-497, 2003.
- ADAMS, M. S. Ecological role of lipids in the health and success of fish populations. In: ARTS, M. T., WAINMAN, B. C. *Lipids in freshwater ecosystems*. New York: Springer-Verlag, 1998. cap. 7, p. 132-160.
- AMARO, Pedro. Pesticidas, saúde e ambiente e os tabus dos pesticidas em Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 31, n. 2, p. 201-216, 2008.
- AMARO, Pedro. A classificação toxicológica dos pesticidas em 2011 em Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 35, n. 2, p. 100-117, 2012.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 2.475 de 08 de junho de 2012. D.O.U. de 11/06/2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M01%2B%2BMalationa.pdf/abfcd7f8-da29-4c99-8586-054cbfbae2e9>> Acesso em 20 de mar. 2022.
- 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*, v. 7, n. 3, p. 503-512, 2018.
- ARAÚJO, R. C. C. Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A2 de *Bothrops jararaca*: avaliação do potencial antitumoral e inflamatório. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ARIAS-ALMEIDA, Juan Carlos; RICO-MARTÍNEZ, Roberto. Inhibition of two enzyme systems in *Euchlanis dilatata* (Rotifera: Monogononta) as biomarker of effect of metals and pesticides. *Biomarkers*, v. 16, n. 1, p. 12-19, 2011.
- BACHMANN, Lorin M.; MILLER, W. Greg. 2020. Spectrophotometry. In: *Contemporary practice in clinical chemistry*. Academic Press. p. 119-133.

- BAKKE, Anne Marie; GLOVER, Chris; KROGDAHL, Åshild. 2010. Feeding, digestion and absorption of nutrients. In: *Fish physiology*. Academic Press. p. 57-110.
- BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS, E. A. 2002. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS letters*, v. 531, n. 1, p. 2-6.
- BANASIK, Marek et al. Selective inhibition of acetylcholinesterase in the cerebellum and hippocampus of mice following an acute treatment with malathion. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, v. 18, n. 6, p. 551-555, 2003.
- BANSAL, Pankaj et al. Hydroxychloroquine: A comprehensive review and its controversial role in coronavirus disease 2019. *Annals of medicine*, v. 53, n. 1, p. 117-134, 2021.
- BARBAZUK, W.B., et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 10, 1351-1358. 2000.
- BARBOZA, HENRIQUETA TALITA G. BARBOZA; SOARES, Antonio Gomes; DA COSTA, João Batista Neves. Síntese de compostos organofosforados com potencial ação fungicida na cultura de mamão (*Carica papaya* L.). Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2009.
- BAVEC, Aljoša. Structure, Function and Regulation of Group IV Phospholipase A 2 Family. *Acta Chimica Slovenica*, v. 58, n. 2, 2011.
- BERTOLETTI, E. Ensaios biológicos com organismos aquáticos e suas aplicações no controle da população. São Paulo: CETESB, 1990.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO (2021) Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, v.52. 2020. Brasília.
- BURBANK, Susan E.; SNELL, Terry W. Rapid toxicity assessment using esterase biomarkers in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Environmental Toxicology and Water Quality*, v. 9, n. 3, p. 171-178, 1994.
- BURKE, John E.; DENNIS, Edward A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling1. *Journal of lipid research*, v. 50, p. S237-S242, 2009.
- BRANCO, N.M.C., ALBERT, A.L.M. and ROMÃO, C.M.C.P. 2021. Emerging Pollutants: Antimicrobials in the environment, environmental education and the national and international regulatory aspect. *Research, Society and Development*, [S. l.], 10 (8), 16910817083.
- CANTINHO, P. et al. Behaviour and fate of metals in urban wastewater treatment plants: a review. *International journal of environmental science and technology*, v. 13, n. 1, p. 359-386, 2016.
- CALABRESE, R. et al. 2009. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Human mutation* 30(8), 1237–1244.

- CALDAS, Eloisa Dutra; DE SOUZA, Luiz César Kenupp R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, p. 529-537, 2000.
- ČALIĆ, Maja et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun-and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology*, v. 219, n. 1-3, p. 85-96, 2006.
- CALIXTO, P. H. M. et al. Gene identification and comparative molecular modeling of a *Trypanosoma rangeli* major surface protease. *J Mol Model*, v. 19, n. 8, p. 3053-64, Ago., 2013.
- CAPRILES, Priscila VSZ et al. Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: putative drug targets for chagas' disease treatment. *BMC genomics*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2010.
- CAPRIOTTI, Emidio; ALTMAN, Russ B. Improving the prediction of disease-related variants using protein three-dimensional structure. *BMC bioinformatics*, v. 12, n. 4, p. 1-11, 2011.
- CAVALCANTI, Laura Patricio AN et al. Intoxicação por organofosforados: tratamento e metodologias analíticas empregadas na avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 3, p. 739-766, 2016.
- CHAGAS, Jumma Miranda Araújo; NINHAUS-SILVEIRA, Alexandre; VERÍSSIMO-SILVEIRA, Rosicleire. Ciclo testicular de *Devario aequipinnatus* (Teleostei, Cyprinidae): Um potencial modelo biológico em experimentação animal. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 42, n. 4, p. 765-779, 2016.
- COLEONE, Ana Carla et al. Analytical method of validation and extraction of malathion in water and soil after fogging against *Aedes aegypti*. *Revista Ambiente & Água*, v. 12, p. 426-434, 2017.
- COLOVIC, Mirjana B. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.
- COSTA, Lucio G. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica chimica acta*, v. 366, n. 1-2, p. 1-13, 2006.
- DAMMSKI, Ana Paula et al. Zebrafish-Manual de criação em Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, p. 20-1, 2011.
- DAUFENBACK, Vanessa et al. Agrotóxicos, desfechos em saúde e agroecologia no Brasil: uma revisão de escopo. *Saúde em Debate*, v. 46, p. 482-500, 2022.
- DAS, Sudipto et al. 2003. Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A2 activation by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 42, p. 41431-41442.

- DA SILVA, Marlene Rodrigues; DE CAMPOS, Ana Caroline Estrope; BOHM, Franciele Zanardo. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 8, n. 2, 2013.
- DA SILVA, Vinícius Augusto Rosa et al. Determinação da estrutura da giroxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por modelagem molecular. *Journal of the Health Sciences Institute*, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 168-72, 2016.
- DE ARAÚJO, N. D. et al. A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. *Estudos de biologia*, v. 30, n. 70/72, 2008.
- DESCHROEDER, TERESA M. FONOVICH; DEDANGELO, A. M. P. The effect of dieldrin on *Clostridium perfringens* phosphatidylcholine phospholipase C activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 51, n. 3, p. 170-177, 1995.
- DENNIS, E. A. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry*, v. 269, n. 18, p. 13057-13060.
- DESSEN, Andréa. 2000. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1488, n. 1-2, p. 40-47.
- DESSEN, Andréa et al. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*, v. 97, n. 3, p. 349-360, 1999.
- DOHERTY, B.T., HOFFMAN, K., KEIL, A.P., ENGEL, S.M., STAPLETON, H.M., GOLDMAN, B.D., OLSHAN, A.F. and DANIELS, J.L. 2019. Prenatal exposure to organophosphate esters and behavioral development in young children in the Pregnancy, Infection, and Nutrition Study. *Neurotoxicology*. 73, 150-160
- DOMINGUES, Mara Regina; ONO, Mario Augusto. PAI-AVRAS-GHAVE Inseticida, agrotóxicos organofosforados, imunotoxicologia, 2000.
- DOS SANTOS JUNIOR, Adeilso Bispo et al. Bioaffinity fishing procedure using secretory phospholipase A2 for screening for bioactive components: Modulation of pharmacological effect induced by sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus* by hispidulin from *Moquiniastrum floribundum*. *Molecules*, v. 25, n. 2, p. 282, 2020.
- ELINDER, F. and LIIN, S.I. 2017. Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels. *Front Physiol.* 8, 43.
- EMSLEY, Paul; COWTAN, Kevin. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica section D: biological crystallography*, v. 60, n. 12, p. 2126-2132, 2004.
- ETO, Morifusa. Organophosphorus pesticides. CRC press, 2018.
- EPSTEIN, Todd M. et al. Crystal structures of brain group-VIII phospholipase A2 in nonaged complexes with the organophosphorus nerve agents soman and sarin. *Biochemistry*, v. 48, n. 15, p. 3425-3435, 2009.

- FAY, Elisabeth Francisconi; SILVA, CMM de S.; DE MELO, Itamar Soares. Degradação abiótica de xenobióticos. 2008.
- FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. 2019. Progress in molecular docking. Quantitative Biology, v. 7, p. 83-89.
- FANG, F. et al., 2009. Inter-relações filogenéticas moleculares dos gêneros de ciprinídeos do sul da Ásia Danio, Devario e Microrasbora (Teleostei, Cyprinidae, Danioninae). Zoologica Scripta 38(2), 237-256.
- FERREIRA, M.; MORADAS-FERREIRA, P.; REIS-HENRIQUES, M. A. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. Aquatic toxicology, v. 71, n. 1, p. 39-48, 2005.
- FINNEY, D.J. 1971. Probit analysis. 3th ed. Cambridge University Press, London. 25pp.
- FRANCO, J. et al. Biochemical alterations in caged Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 864–872. 2010.
- FRIEDRICH, Karen et al. Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. Cadernos de Saúde Pública, v. 37, 2021.
- GOLDSMITH P. 2004. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. Curr Opin Pharmacol 4(5), 504-512.
- GHOSH, Moumita et al. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. Progress in lipid research, v. 45, n. 6, p. 487-510, 2006.
- GRUNWALD, D.J. and EISEN, J.S. 2002. Headwaters of the zebrafish - surgimento de um novo modelo de vertebrado Nature Reviews Genetics 3, 717–724.
- GUIDO, Rafael VC; ANDRICOPULO, Adriano D. Modelagem molecular de fármacos. Revista Processos Químicos, v. 2, n. 4, p. 24-36, 2008.
- GULARTE, Jonas Albandes et al. TRATAMENTO DE SEMENTES COM MALATHION E QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARROZ. Revista Científica Rural, v. 20, n. 2, p. 215-225, 2018.
- HATTORI, M., ADACHI, H., TSUJIMOTO, M., ARAI, H. and INOUE, K.1994. The catalytic subunit of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase is a novel type of serine esterase. J Biol Chem. 269(37), 23150-5.
- HAGEN, J. B. The origins of bioinformatics. Nature Reviews Genetics, v. 1, n. 3, p. 231-236, 2000.
- HALILOGLU, H.I. et al. 2003. Comparisons of fatty acid composition in some tissues of

- rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) living in seawater and freshwater. *Food Chemistry* 86,55-59.
- HESPANHOL, I. Reúso potável direto e o desafio dos poluentes emergentes. *Revista USP*, n. 106, p. 79-94, 2015.
- HILL, A. J., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., & PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 86, 6-19. 2005.
- HIRABAYASHI, Tetsuya; SHIMIZU, Takao. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1488, n. 1-2, p. 124-138, 2000.
- HUANG Q, WU Y, QIN C, HE W, WEI X. Phylogenetic and structural analysis of the phospholipase A2 gene family in vertebrates. *Int J Mol Med.* 2015 Mar;35(3):587-96
- HUANG, Yong et al. Functional characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from *Bactrocera dorsalis*: possible involvement in susceptibility to malathion. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 18394, 2015.
- JAKHAR, Ritu et al. 2020. Relevance of molecular docking studies in drug designing. *Current Bioinformatics*, v. 15, n. 4, p. 270-278.
- JOBLING, M. *Environmental biology of fishes*. London: Chapman & Hall. p. 455. 1995.
- KARMAKAR, Subrata et al. Vitamin B12 alleviates malathion-induced toxicity in zebra fish by regulating cytochrome P450 and PgP expressions. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 33, n. 5, p. 364-377, 2023.
- KING, Andrew M.; AARON, Cynthia K. Organophosphate and carbamate poisoning. *Emergency Medicine Clinics*, v. 33, n. 1, p. 133-151, 2015.
- KINTH, P. et. al., 2013. Mapping of the zebrafish research: a global outlook. *Zebrafish* 10, 510-517.
- KIM, Oanh TP et al. A draft genome of the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, for comparative analysis of genes relevant to development and a resource for aquaculture improvement. *BMC genomics*, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2018.
- KRICZINSKI, R.; ROMANELLO, L. Modelagem molecular comparativa da enzima Adenilsuccinato Sintetase (ADSS) do parasito *Schistosoma mansoni*. *Luminária, União da Vitória*, v. 22, n. 02, p. 31-39, 2020.
- KRUGER, Nicholas J. The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, p. 17-24, 2009.
- KRYSAN, James L.; GUSS, Paul L. Paraoxon inhibition of an insect egg lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, v. 239, n. 2, p. 349-352, 1971.
- KUGATHAS, Subramaniam et al. Effects of common pesticides on prostaglandin D2 (PGD2)

- inhibition in SC5 mouse Sertoli cells, evidence of binding at the COX-2 active site, and implications for endocrine disruption. *Environmental health perspectives*, v. 124, n. 4, p. 452-459, 2016.
- KÜLTZ, D. 2015. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *J Exp Biol.* 218(Pt 12),1907-14.
- KUMAR, M.; SODHI, K. KA; SINGH, D. K. Bioremediation of Penicillin G by *Serratia* sp. R1, and enzymatic study through molecular docking. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, v. 12, p. 100246, 2019.
- KURTOVIC, Ivan *et al.*, 2009. Lipases from mammals and fishes. *Reviews in fisheries science*, v. 17, n. 1, p. 18-40.
- LASKOWSKI, Roman A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.
- LEAL, P. R. et al. Impact of copper sulfate application at an urban Brazilian reservoir: a geostatistical and ecotoxicological approach. *Science of the Total Environment*, v. 618, p. 621-634, 2018.
- LESLIE, Christina C. 2015. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *Journal of lipid research*, v. 56, n. 8, p. 1386-1402.
- LIESCHKE, G.J., CURRIE, P.D., 2000. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353-367.
- LIU, Yueqin *et al.* 2014. The fish oil ingredient, docosahexaenoic acid, activates cytosolic phospholipase A2 via GPR120 receptor to produce prostaglandin E2 and plays an anti-inflammatory role in macrophages. *Immunology*, v. 143, n. 1, p. 81-95.
- MACRAE, C.A. et al., 2015. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 14(10), 721-731.
- MAGALHÃES, Natália Mendes Gomes et al. Registro e perfil ecotoxicológico de produtos para controle de *Aedes aegypti*. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, v. 9, n. 1, p. 71-81, 2021.
- MAHMOOD, Isra et al. Effects of pesticides on environment. *Plant, soil and microbes: volume 1: implications in crop science*, p. 253-269, 2016.
- MAKHAEVA, Galina F. et al. Organophosphorus compound esterase profiles as predictors of therapeutic and toxic effects. *Chemico-biological interactions*, v. 203, n. 1, p. 231-237, 2013.
- MANNHOLD, Raimund; KUBINYI, Hugo; TIMMERMAN, Hendrik. *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. John Wiley & Sons, 2008.
- MANDREKAR, N. and THAKUR, N.L. 2009. Significance of the zebrafish model in the discovery of bioactive molecules from nature. *Biotechnol Lett.* 31(2), 171-179.

- MANGAS, I., ESTEVEZ, J., VILANOVA, E. and FRANÇA, T.C. 2017. New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases. *Toxicology* 376, 30-43.
- MARKWORTH, J.F. and CAMERON-SMITH, D. 2013. Arachidonic acid supplementation enhances *in vitro* skeletal muscle cell growth via a COX-2-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 304(1), C56-67.
- MARTIN, Richard J.; ROBERTSON, Alan P.; CHOUDHARY, Shivani. Ivermectin: An Anthelmintic, an Insecticide, and Much More. *Trends in parasitology*, 2020.
- MARTIN, Benjamin T. *et al.* 2017. Integrating lipid storage into general representations of fish energetics. *Journal of Animal Ecology*, v. 86, n. 4, p. 812-825.
- MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi In: Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.A.; Pimenta, J.A. (Eds.) *A bacia do rio Tibagi*. Londrina: 2002. Cap. 29, p. 551 – 577.
- MANSON, C. F. *Biology of freshwater pollution*. 3.ed. Londres: Longman, 1996.
- MANZI, Agatha et al. Theoretical evaluation of the malathion and its chemical derivatives interaction with cytosolic phospholipase A2 from zebrafish. *Chemosphere*, v. 311, p. 136984, 2023.
- MASSON, Patrick et al. A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. *Chemico-biological interactions*, v. 175, n. 1-3, p. 273-280, 2008.
- MATOS, A.P. 2019. Polyunsaturated fatty acids and nutritional quality of five freshwater fish species cultivated in the western region of Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology* 22, e2018193.
- MELLO, N. P. de et al. Toxicidade aguda e risco ambiental do malathion aplicado em nebulização contra *Aedes aegypti* para organismos aquáticos / Acute toxicity and environmental risk of malathion applied in nebulization against *Aedes aegypti* for aquatic organisms. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v. 4, n. 1, p. 571–578, 2021. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJAER/article/view/24122/19312>>.
- MELO, Carlos Fernando Odir Rodrigues et al. The role of lipids in the inception, maintenance and complications of dengue virus infection. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.
- MENG, XUAN-YU et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.
- MEVES H. 2008. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br J Pharmacol.* 155(1), 4-16.
- MONTAGNER, C.C., VIDAL, C. AND ACAYABA, R.D. 2017. Emerging contaminants in aquatic matrices from brazil: current scenario and analytical, ecotoxicological and

legislational aspects. Quím. Nova 40 (9) • Nov 2017.

- MORAES, Gilberto; DE ALMEIDA, Luciana Cristina. 2020. Nutrition and functional aspects of digestion in fish. In: Biology and physiology of freshwater neotropical fish. Academic Press. p. 251-271.
- MOUHLIS, V.D. and Dennis, E.A. 2019. Phospholipase A2 catalysis and lipid mediator lipidomics. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 1864(6), 766-771.
- MUKHERJEE, Anil B.; MIELE, Lucio; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A2 enzymes: regulation and physiological role. Biochemical pharmacology, v. 48, n. 1, p. 1-10, 1994.
- MURAKAMI, Makoto et al. A new era of secreted phospholipase A2. Journal of lipid research, v. 56, n. 7, p. 1248-1261, 2015.
- NARAHARISETTI, Suresh Babu et al. Effects of simultaneous repeated exposure at high levels of arsenic and malathion on hepatic drug-biotransforming enzymes in broiler chickens. Environmental toxicology and pharmacology, v. 28, n. 2, p. 213-218, 2009.
- ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO-OCDE. Perspectivas da OCDE sobre as Competências para 2013: primeiros resultados do estudo sobre as competências de adultos. 2014.
- PEREIRA, F.S.S.; SARAIVA, L.A.; SILVEIRA, N.J.F.; VELOSO, M.P. Revista Eletrônica de Farmácia Vol. X (2), 42 - 52, 2013.
- PÉREZ-LEGASPI, Ignacio Alejandro; RICO-MARTÍNEZ, Roberto. Phospholipase A2 activity in three species of littoral freshwater rotifers exposed to several toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, v. 22, n. 10, p. 2349-2353, 2003.
- PETTERSEN, Eric F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. Journal of computational chemistry, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- PETRONILHO, Elaine C.; FIGUEROA-VILLAR, José Daniel. Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos. Revista Virtual de Química, v. 6, n. 3, p. 671-686, 2014.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. International journal of molecular sciences, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.
- PIGNATI, Wanderlei Antonio et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. Ciência & Saúde Coletiva, v. 22, p. 3281-3293, 2017.
- PIRES, C. L. et al. Sulfated polysaccharide extracted of the green algae *Caulerpa racemosa* increase the enzymatic activity and paw edema induced by sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus* venom. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 23, n. 4, p. 635-643, 2013.

- QUACH, N. D.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochemical pharmacology*, v. 90, n. 4, p. 338-348, 2014.
- RAINSFORD, K. D. et al. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology*, v. 23, n. 5, p. 231-269, 2015.
- REED, N. R.; RUBIN, A. L. Malathion. In: *Encyclopedia of Toxicology*. 2014. p.133-137.
- RIBEIRO, G.de O. et al. Detection of RNA-dependent RNA polymerase of Hubei reo-like virus 7 by next-generation sequencing in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from Brazil. *Viruses*, v. 11, n. 2, p. 147, 2019.
- RICO-MARTÍNEZ, R. et al. Rotifers as models in toxicity screening of chemicals and environmental samples. *Invertebrates–Experimental Models in Toxicity Screening*. InTech, p. 57-99, 2016.
- RIPON, M.A.R., et al., 2021. Role of arachidonic cascade in COVID-19 infection: A review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 154,106539.
- ROBERTS, Darren M.; AARON, Cynthia K. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Bmj*, v. 334, n. 7594, p. 629-634, 2007.
- ROCHA, L. C. S.; SPINOSA, H. S. Praguicidas organofosforados e carbamatos: algumas considerações. *Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v. 16, n. 1/2, p. 41-44, 1992.
- RODUNER, Emil. 2014. Understanding catalysis. *Chemical Society Reviews*, v. 43, n. 24, p. 8226-8239.
- ROMANELLO, Larissa; KRICZINSKI, Rafaela. Modelagem molecular comparativa da enzima Adenilsuccinato Sintetase (ADSS) do parasito *Schistosoma mansoni*. *LUMINÁRIA*, v. 22, n. 02, 2021.
- ROSENBAUM, E. A. et al. Early biochemical changes produced by malathion on toad embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 17, n. 6, p. 831-835, 1988.
- SALI, A; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, v. 234, p. 779-815, 1993.
- SALI, A.; OVERINGTON, J. P. Derivation of rules for comparative protein modeling from a database of protein structure alignments. *Protein Sci.*, v. 3, p. 1582-1596, 1994.
- SAMANTA, Uttamkumar et al. Crystal structures of human group-VIIA phospholipase A2 inhibited by organophosphorus nerve agents exhibit non-aged complexes. *Biochemical pharmacology*, v. 78, n. 4, p. 420-429, 2009.

- SANTOS, Viviane Martins Rebello dos et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, v. 30, p. 159-170, 2007.
- SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. de. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*, v. 26, n. 2, p. 253–259, mar. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000200019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.
- SANTOS-FILHO, O. A.; DE ALENCASTRO, R. B.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Homology modeling of wild type and pyrimethamine/cycloguanil-cross resistant mutant type *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. A model for antimalarial chemotherapy resistance. *Biophysical Chemistry*, v. 91, n. 3, p. 305–317, jul. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462201001806>>.
- SANTOS-PINTO, Cláudia Du Bocage; MIRANDA, Elaine Silva; OSORIO-DE-CASTRO, Claudia Garcia Serpa. O “kit-covid” e o Programa Farmácia Popular do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 37, p. e00348020, 2021.
- SARGENT, J.G.M. et al. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177,191-199.
- SCHAEFFER, E. L.; BASSI, F.; GATTAZ, W. F. 2005. Inhibition of phospholipase A 2 activity reduces membrane fluidity in rat hippocampus. *Journal of Neural Transmission*, v. 112, p. 641-647.
- SCOTT, David L. et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science*, v. 250, n. 4987, p. 1541-1546, 1990.
- SHIFATU, Olubusola et al. Heart development, coronary vascularization and ventricular maturation in a giant danio (*Devario malabaricus*). *Journal of Developmental Biology*, v. 6, n. 3, p. 19, 2018.
- SIRISHA, Gandreddi VD et al. Molecular docking and *in vitro* studies of soap nut trypsin inhibitor (SNTI) against phospholipase A2 isoforms in therapeutic intervention of inflammatory diseases. *International journal of biological macromolecules*, v. 114, p. 556-564, 2018.
- SIRIANANT, L., et al., 2016. Cellular volume regulation by anoctamin 6: Ca²⁺, phospholipase A2 and osmosensing. *Pflügers Arch.* 468(2), 335-349.
- SLOTKIN, Theodore A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 198, n. 2, p. 132-151, 2004.
- SMICHI, Nabil et al. 2012. Lipolytic activity levels and colipase presence in digestive glands of some marine animals. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 1449-1458.
- STAHELIN, Robert V. Phospholipid Catabolism. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, 2016. p. 237-257.

- STERN, H.M. & ZON, L.I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Rev. Cancer* 3, 1-7. 2003.
- SOUZA, João Pedro de Albuquerque. Estudo de ancoragem molecular de derivados de ácido cinâmico frente à enzimas do ciclo replicativo do HIV-1. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- STRÄHLE, U. et al., 2010. The zebrafish embryo as a model for assessing off-target drug effects. *Dis Model Mech.* 3(11-12), 689-692.
- TALLIMA, H. and EL RIDI, R. 2018. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *Journal of Advanced Research* 11, 33-41.
- TANG, K.L. et al., 2010. Systematics of the subfamily danioninae (Teleostei: Cypriniformes: cyprinidae) *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57, 189–214.
- TESKE, L. P. Análise por simulação computacional de derivados teóricos da sibutramina. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- TERRY, A.V. Jr. 2012. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacol Ther.* 134(3), 355-365.
- TJOELKER, L.W., EBERHARDT, C., UNGER, J., TRONG, H.L., ZIMMERMAN, G.A., MCINTYRE, T.M., STAFFORINI, D.M., PRESCOTT, S.M. and GRAY, P.W. 1995. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem.* 270(43), 25481-7.
- TOCHER, D.R. 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449, 94-107.
- TOYAMA, M.H., et al., 2019. Edema Induced by sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus* Involves PLC and PKC Signaling, Activation of cPLA2, and Oxidative Stress [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.80848.
- TROTT, O; OLSON, A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.
- TRIGGIANI, M, et al. Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 116, n. 5, p. 1000-1006, 2005.
- TRISCIUZZI D. et al Molecular docking for predictive toxicology. In: Nicolotti O (ed) *Computational toxicology*. Springer New York, New York, pp 181–197. 2018.
- TU, Mengchen et al. 2021. Typical organic pollutant-protein interactions studies through spectroscopy, molecular docking and crystallography: A review. *Science of The Total Environment*, v. 763, p. 142959.

- VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13; 57_/1492003.
- VASQUEZ, A.M., MOUCHLIS, V.D. and DENNIS, E.A. 2019. Review of four major distinct types of human phospholipase A2. Published in final edited form as: *Adv Biol Regul.* 2018 Jan; 67, 212–218.
- VILCHIS-LANDEROS, M.M., et al., 2020. Regulation of Metabolic Processes by Hydrogen Peroxide Generated by NADPH Oxidases. *Processes* 2020, 8, 1424.
- XIAOLIM. L.; YE, L.; WANG, X.; WANG, X.; LIU, H.; ZHU, Y.; YU, H., Combined 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics study on thyroid hormone activity of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers to thyroid receptors β , *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 265, p. 300–307, 2012.
- YEE, D. et al. Age estimates and pollutant concentrations of sediment cores from San Francisco Bay and wetlands. Oakland, CA, 2011.
- YOKOYAMA, Shigeyuki et al. Structural genomics projects in Japan. *nature structural biology*, v. 7, n. 11, p. 943-945, 2000.
- YU, J.R., HOU, Y.C., FU, J.F., WANG, I.K., CHAN, M.J., CHEN, C.Y., WENG, C.H., HUANG, W.H., YANG, H.Y., HSU, C.W. and YEN, T.H. 2021. Outcomes of elderly patients with organophosphate intoxication. *Sci Rep.* 11(1), 11615.
- YUAN, Shuguang; CHAN, HC Stephen; HU, Zhenquan. Using PyMOL as a platform for computational drug design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, v. 7, n. 2, p. e1298, 2017.
- WALLACE, ANDREW C.; LASKOWSKI, ROMAN A.; THORNTON, JANET M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering, design and selection*, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.
- WALKER, S. D.; MCELDFOWNEY, S. Molecular docking: A potential tool to aid ecotoxicity testing in environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Chemosphere*, v. 93, n. 10, p. 2568-2577, 2013. WATSON, James D.; CRICK, Francis HC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.
- WALKER, C.H. SIBLY, R.M. HOPKIN, S.P. PEAKALL D.B. *Principles of Ecotoxicology*, Fourth Edition. Londres: Taylor & Francis Group. New York. 2012.
- ZAGREBIN, A. O.; RUMYANTSEV, V. A.; TONKOPII, V. D. Developing methods for bioidentification of xenobiotics for water quality assessment. *Water Resources*, v. 43, n. 1, p. 141-144, 2016.
- ZHOU, L. et al. Environmental concentrations of antibiotics impair zebrafish gut health. *Environmental Pollution*, v. 235, p. 245-254, 2018.

ZON, L.I., and Peterson, R.T. 2005. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. Nat Rev Drug Discov. 4(1), 35-44.

ZUCKER, Elizabeth. Hazard evaluation division standard evaluation procedure: acute toxicity test for freshwater fish. US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, 1985.

ANEXOS

I



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação experimental do malathion como potencial agente inflamatório agudo por meio da inibição da enzima PAF AH.", Protocolo nº 09/2022-CEUA, sobre a responsabilidade do **Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama** e sua orientada **Agatha Manzi De Carli**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA, do Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista, em reunião de 28/10/2022.

Vigência do Projeto:	12/03/2021 a 12/03/2023
Espécie/linhagem:	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) e <i>Danio gigante</i> (<i>Devario malabaricus</i>)
Número de animais:	40 indivíduos de <i>Danio rerio</i> e 100 indivíduos de <i>Devario malabaricus</i>
Peso/Idade:	Aproximadamente 2g (<i>Danio rerio</i>) e 4g (<i>Devario malabaricus</i>) / de 1,5 a 2 a
Sexo:	Indeterminado
Origem:	Lojas de Aquarismo (Santos/SP)

São Vicente, 04 de novembro de 2022

Prof. Dra. Alessandra da Silva Augusto
Coordenadora – CEUA



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Theoretical evaluation of the malathion and its chemical derivatives interaction with cytosolic phospholipase A2 from zebrafish

Agatha Manzi, Master student^{a,b,*}, Bruno Paes De-Carli, Professor^{b,c}, Airam Roggero, Professor^{a,b}, Laila Lucyane Ferreira De Moraes, Professor^{a,b}, Isabelly Annunciato, Master Student^{a,b}, Mariana Novo Belchor, Professor^b, Daniel Ferreira De Lima Neto, Researcher^d, Marcos Antonio De Oliveira, Professor^a, Marcos Hikari Toyama, Professor^{a,b}

^a Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Vicente, SP, Brazil

^b BIOMOLPEP, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Vicente, 11330-900, São Paulo, Brazil

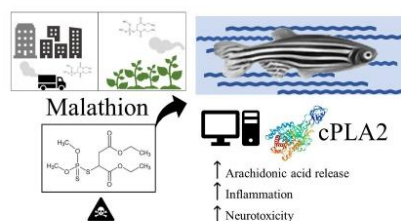
^c Universidade Paulista UNIP, Santos, SP, Brazil

^d Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde (DAEVS), Brazil

HIGHLIGHTS

- Phospholipase A2 (PLA2) is an enzyme that acts in lipid metabolism and inflammation.
- The zebrafish has a PLA2 homologous to that of humans.
- Malathion and their metabolites can be attached to the catalytic site of zebrafish PLA2.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Phospholipase A2
Organophosphates
Docking molecular
Xenobiotics

ABSTRACT

Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) belongs to a large family of proteins and plays a crucial role in the regulation of arachidonic acid metabolism and inflammation cascade in zebrafish (*Danio rerio*). This enzyme with a molecular weight of 85 kDa, has two distinct domains. One is the regulatory and calcium-dependent (Ca^{2+}) domain called C2, the other is the catalytic α/β hydrolase Ca^{2+} -independent domain, where serine and aspartic acid catalytic dyad residues are present. We investigated the interaction of malathion and their organophosphate metabolites in the cPLA2 using *in silico* tools. Molecular docking results showed hydrophobic interactions with the paraoxon and catalytic site residue (Ser 223). Malathion increases intracellular Ca^{2+} due to endoplasmic reticulum influx which in turn activates phospholipase A2 and arachidonic acid release. Molecular docking and homology modelling of proteins and ligands could be a complementary tool for ecotoxicology and environment pollution assessment.

* Corresponding author. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Vicente, SP, Brazil.
E-mail address: agatha.manzi@unesp.br (A. Manzi).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136984>

Received 29 March 2022; Received in revised form 11 October 2022; Accepted 20 October 2022

Available online 25 October 2022

0045-6535/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

cPLA2zf	MSNIEVHQYSHRLKLTWRAENVTKGAFGDLDDTPDYPVLSVPTTPESRKTRHINND	60
cPLA2hs	--HIIVEHQYSHKFTVVLRATKVTGAFGDMLDTPDYPVLFISTTPDSRKTRHFINND	58
cPLA2zf	INPKWNETFEFILDPIQSNVLEVTLMADANYVMDLTGTAKYSLSKLVAQMEHVTLSIGK	120
cPLA2hs	INPVWNETFEFILDPIQENVLEITLMADANYVMDLTGTATFTVSSMKVGEKKEVPFIFNQ	118
cPLA2zf	TTKVFLDLLLEVCASDLRFMTLDQEKLFMQTRRDVMSIKKLLKMNPRFLPSSPR	180
cPLA2hs	VTEMVLEMSLEVCSCLPDLRFMTLDQEKLFMQTRRDVMSIKKLLKMNPRFLPSSPR	177
cPLA2zf	EVPTIAILGSGGGFRAMVGFSGVMKALYESGVFDCATYVAGLSSTWYMSMLYSHPEFPA	240
cPLA2hs	DVPVVAIILGSGGGFRAMVGFSGVMKALYESGVFDCATYVAGLSSTWYMSMLYSHPEFPA	237
cPLA2zf	KGPGDINKELMNRVSNPLKLLPQINRYVKALWKKKSAGQPVTFDIFGMLIGETLIP	300
cPLA2hs	KGPPEINEELMKVSNPLKLLPQINRYVKALWKKKSAGQPVTFDIFGMLIGETLIH	297
cPLA2zf	GRMNIKLSLKGKINQSQPLPLFTCLHVKPDVSELMFADWVEFSPYEIGMAKYGTFMSP	360
cPLA2hs	NRMNTLSLKGKINQSQPLPLFTCLHVKPDVSELMFADWVEFSPYEIGMAKYGTFMSP	357
cPLA2zf	GLFGSKFFMGVWVKKYEENPLHFLMGVWGSFSLFNRVLGVKETTS--SSTMEEELEQIK	419
cPLA2hs	DLFGSKFFMGVWVKKYEENPLHFLMGVWGSFSLFNRVLGVGSQSRGTSMEEELEQIK	417
cPLA2zf	PEHIVGDSADNEETQ--RGGESADAEDERQHAQASWQRMILTSIMGDTTLFTTREG	478
cPLA2hs	TKHIVSNDSSDDESHPEKGTENEDAGSDYQSDNQASWQRMILTSIMGDTTLFTTREG	477
cPLA2zf	AGKVHNFMLGLNLNLTLPSPFSGITHQTSLEEEV--DAVTDPEFERIYEPDVKSKKI	536
cPLA2hs	AGKVHNFMLGLNLNLTLPSPFSGITHQTSLEEEV--DAVTDPEFERIYEPDVKSKKI	537
cPLA2zf	HWISGLTFNLPPYLILRCQGVDLIISDF SARPSDSSPPFKELLAEKWARWKLFPF	596
cPLA2hs	HWISGLTFNLPPYLILRCQGVDLIISDF SARPSDSSPPFKELLAEKWARWKLFPF	597
cPLA2zf	KIDSKVDFREGKCEYVFKPAKGD--KNCPTIIHFLANINFRNFKAPGVPRDSKDIEF	654
cPLA2hs	KIDPYVDFREGKCEYVFKPKNPDMKDCPTIIHFLANINFRNFKAPGVPRETEEEKEI	657
cPLA2zf	GDFDIFDEPASPSTFNFQYQAFKRLHDLMEFNTLNIEVIEKAIKDSILLRRENPAP	714
cPLA2hs	ADFDFIDDPESPSTFNFQYQAFKRLHDLMEFNTLNIEVIEKAIKDSILLRRENPAP	717
cPLA2zf	CSVSLSLSEIENKKFLKRDNSIAKRPT	741
cPLA2hs	CSVSLSLNVEA--RRFFNKEF-----	735

Fig. 1. Sequence alignment of human cytosolic phospholipase A2 enzyme (cPLA2hs) and zebrafish cytosolic phospholipase A2 (cPLA2zf). The regions highlighted in red represent the catalytic dyad of both enzymes (zebrafish, Ser223 and Asp540; humans, Ser228 and Asp549). The asterisk (*) represents conserved regions and a colon (:) represents different regions. This figure was obtained in CLUSTAL W. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2. Introduction

The enormous advance of molecular biology techniques such as genome sequencing, production of big data, proteins discovery and other biological data, emphasize the need for computing through bioinformatics. *In silico* methods allow to determine the function and tertiary structure of proteins as well as to predict possible implications of the structure and function of these macromolecules in contact with inhibitors or ligands (Calabrese et al., 2009; Capriles et al., 2010 and Capriotti and Altman, 2011). Studies related to bioinformatics and analysis of genomic data reveal that some organisms, represented by *Danio rerio* (zebrafish) which have two abundant groups of phospholipases A2 (PLA2). These enzymes exhibit great structural similarities with PLA2 cytosolic calcium dependent (cPLA2) from human (Huang et al., 2015; Kim et al., 2018).

Homology modeling methods are used to elucidate the tertiary structure of proteins and are increasingly used in proteomics. This technique, also known as comparative protein modeling, is one of the most accurate procedures, producing useful models of great magnitude from already existing sequences. All current protein homology modeling methods consist of four steps: target structure and template selection; alignment; model construction and evaluation (Santos-Filho and Alencastro, 2003). Comparison with known structures promotes important applications for the study of some compounds, including the proteins interaction with bioligands to be applied in three-dimensional structures

of proteins (Wu et al., 2009).

Molecular docking is a well-established *in silico* technique which the main objective is the discovery of new drugs and their relationship with macromolecules. Through this, it is possible to identify new compounds for therapeutic purposes, predict interactions between target-ligands at the molecular level, and delineate the relationship between chemical structures (Pinzi and Rastelli, 2019). In addition, docking allows predicting the effects of emerging pollutants in the aquatic environment considering the homology between human and aquatic animal enzymes. In a study carried out with several aquatic vertebrates, it was possible to evidence the interaction between anti-inflammatory drugs and the respective enzymes present in these organisms (Walker and Mceldowney, 2013; Kumar et al., 2019).

The Group 4 (G4) phospholipase A2 family is composed of six intracellular enzymes commonly called cPLA2 alpha, cPLA2beta, cPLA2gamma, cPLA2delta, cPLA2epsilon, and cPLA2zeta. These enzymes exhibit a high molecular weight with a catalytic domain composed by conserved Ser/Asp dyad, which contain residues involved in protein regulation that can be described as a phosphorylation site (Leslie, 2015). Therefore, enzymes which belong to cPLA2 family are characterized by the presence of a C2 domain in their N-terminal region, responsible for Ca^{2+} -dependent association with membrane, except for cPLA2 γ , in which this domain is absent (Ghosh et al., 2006; Bavec, 2011; Leslie, 2015 and Stahelin, 2016). These macromolecules are cytosolic enzymes present in some cells such as macrophages, platelets and kidney

cells, which intercede the release of arachidonic acid (AA) leading to the production of eicosanoids (Clark et al., 1990).

Activation of cPLA2 involves post-translational processes like an increased intracellular Ca^{2+} concentration, phosphorylation by specific serine and threonine protein kinase (MAPK) and phycotoxins (okadaic acid). The rise of Ca^{2+} concentration provides the protein translocation from the cytosol to Golgi complex membranes, endoplasmic reticulum and nuclear envelope (Gijón et al., 1999).

The enzyme amino-terminal region presents binding loops for Ca^{2+} . In this region two ions bind on the C2 domain binding face with the membrane, which provides an increase in the hydrophobicity of the region, allows translocation and ensures protein stability. Thus, the Ca^{2+} -independent catalytic domain is installed in the membrane with the tryptophan residue support that establishes the connection (Leslie, 2015). The enzyme catalytic domain is composed by a core α/β hydrolase region conserved throughout many different lipases and esterases (Burke and Dennis, 2009; Bauer et al., 2020).

Several biological responses can be observed in fish, including chemicals bioaccumulation, biomarkers used in the assessment of environmental risks, physiological and even morphological variations (Van der Oost et al., 2003). In this context, fish attract much attention in biomonitoring of water pollution due to specific intrinsic characteristics (Zhou et al., 2018). Among them are: (a) relatively large size, (b) long life cycle, (c) ease of growth, etc. Phylogenetic PLA2 relationships reveal zebrafish and other fish have at least three groups of phospholipases A2: two secretory and one group of cytosolic PLA2 (Huang et al., 2015; Murakami et al., 2015). Recently, two cpla2a genes (pla2g4aa and pla2g4ab) were identified in zebrafish and the cpla2a gene is involved in prostaglandin synthesis in its ovary (Tang et al., 2017).

Organophosphorus are compounds used in agriculture crops and against disease-carrying insects. Due to short half-life, this chemical produces some metabolites in aqueous medium. For example, their malathion analogues inhibit PLA2 and other esterases activity such as butyl cholinesterase (BChE) in a dose-dependent manner (Petrotian et al., 1997; Epstein et al., 2009). Therefore, it is essential to understand the mechanism that involves PLA2 and xenobiotics interaction. The present study aimed to build a molecular model of zebrafish cPLA2 and to characterize the interaction between malathion metabolites and enzyme catalytic site using bioinformatics tools.

3. Materials and methods

In silico analysis involves two basic steps: (a) prediction of the ligand conformation, as well as its position and orientation within the molecule structure; (b) assessment of binding affinity. These two steps are related to the data collection methods and respective scoring schemes. Understanding the location of catalytic sites significantly increases docking efficiency (Meng et al., 2011).

3.1. Identification and selection of target protein

The first step for model development was to identify the homology between human cytosolic PLA2 (PDB: 1CJY) and zebrafish sequences (Uniprot: P50392) by screening in RCSB Protein and UniProt databases. The search for template and target proteins has as main objective to correlate the sequences through an algorithm that aims to find the similarity between them. Enzymes sequences with similarity >30% were selected using the basic local alignment search tool (BLAST) (Altschul et al., 1997; Santos-Filho and Alencastro, 2003). The query cover and identity percentage (%) were used to select best model construction. Our study demonstrates a greater similarity (72,6%) between PLA2 from human and zebrafish amino acids sequences and catalytic site (Fig. 1).

3.2. Model construction and validation

The approach for building the model through the analysis of rigid

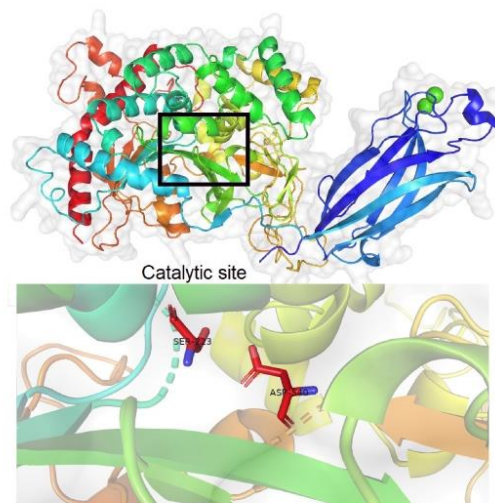


Fig. 2. Ribbon schematic visualization of the cytosolic phospholipase A2 protein model of *Danio rerio* developed on the Swiss-Model platform with emphasis on the catalytic site Ser 223 and Asp 540. This image was developed using Pymol software.

bodies was used. This analysis has the characteristic of building a model from rigid bodies obtained from the main chains of the aligned regions. It was necessary to insert the amino acid sequences in the Swiss Model platform for the construction of the models. The selection of the best model is related to the Ramachandran plot generated by the aforementioned platform (Schwede et al., 2003; Waterhouse et al., 2018).

After the development of the model, it was necessary to identify possible errors related to the selection of the target structure and model. Molprobit software (Chen et al., 2010) was used to minimize the energy of the final protein structure. At this stage, the ProCheck software was used for stereochemical evaluation and verification of the location of residues in favorable and unfavorable regions (Laskowski et al., 1993).

3.3. Molecular docking

The ligand files were obtained from the PubChem platform in 3D format with the SDF extension. Then the AutoDock 1.5.6 application was employed to add polar hydrogen atoms and aggregate the Kollman charges. After all the modifications, the files were converted with the extension PDBQT (Teske, 2019). For the docking, it was necessary to perform the calculations of the energy grid maps (grid Box) through the AutoDock Tools program. The size chosen was sufficient to encompass all the amino acids of the catalytic site microenvironment. The x, y and z coordinate information were saved for later use corresponding to: X = 48.99; Y = -5.26 and Z = 58.92 (Sirisha et al., 2018).

Molecular docking experiments were performed using the Vina AutoDock tool (Trott and Olson, 2009). As ligands, the following metabolites of the organophosphate in question were evaluated: malathion (PubChem: 4004), malaoxon (PubChem: 15,415) and paraoxon (PubChem: 9395). Preliminarily, 250 docking simulations were performed on the Swiss Dock Platform (<https://www.swissdock.ch>) to determine the region with the most couplings. To fully understand the interaction of the protein with the ligand, it was necessary to use the Chimera software to dismember the catalytic domain (C2) and perform a molecular docking study separately with malathion. For this purpose, a grid box was created in order to encapsulate the entire domain region, so the

Table 1
Molecular docking results between phospholipase A2 cytosolic model from *Danio rerio* with malathion and metabolites. Root means square deviation (RMSD).

PubChem ID	Compound	Gibbs energy of binding (kcal mol ⁻¹)	RMSD
4004	Malathion	-5.4	0.0
15,415	Malaoxon	-5.7	0.0
9395	Paraoxon	-6.3	0.0

coordinates were X = 85,543; Y = 34,226 and Z = 55,131. Results were expressed as binding free energy (kcal mol⁻¹) values.

4. Results and discussion

4.1. cPLA2 from zebrafish

The identity percentage of the target protein (PDB code: P50392) compared to human cPLA2 (PDB code: 1CJY) (template) was 72.67% with a significance level of 0.00 (e-value). As seen in the Ramachandran plot, it is possible to observe that most of the residues are positioned in the favorable region 92.45%. The modeled protein has 704 amino acid residues, exhibiting 236 α -helix residues, 122 residues in β -sheet and 346 in coil regions (Fig. 2).

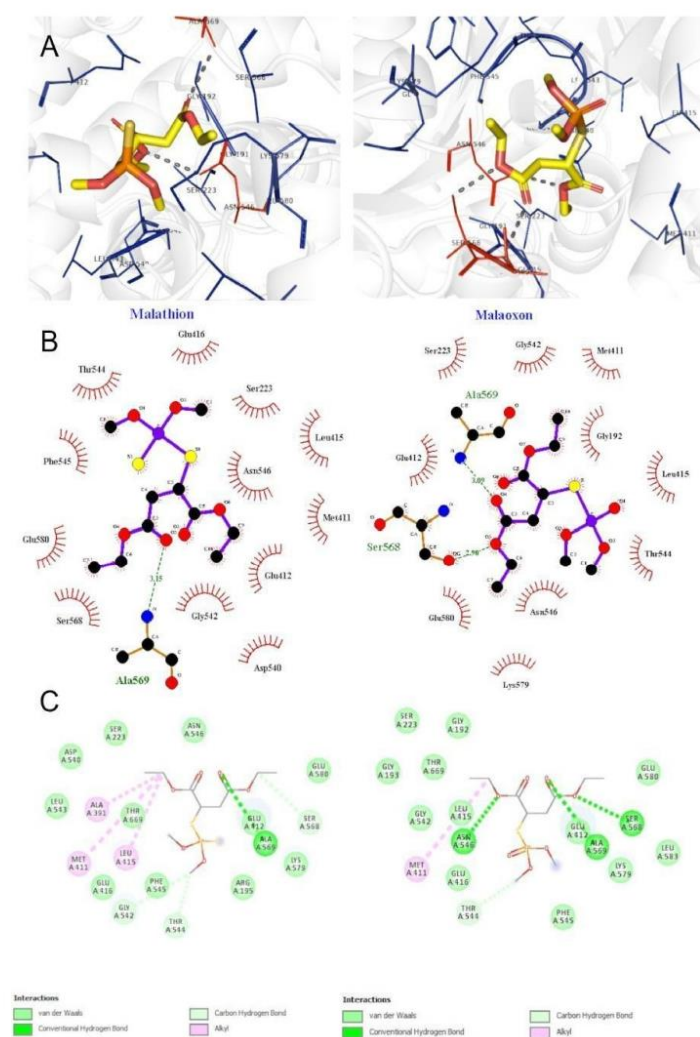


Fig. 3. (A) Three dimensional diagrams of malathion and malaoxon derivative interaction with cPLA2 protein from *Danio rerio*. The ligands are highlighted in yellow (carbon), orange (sulfur) and red (oxygen). (B) and (C) represent the interactions visualization between ligands atoms and protein. These figures were generated in Pymol, LigPlot⁺ and Discovery and software respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

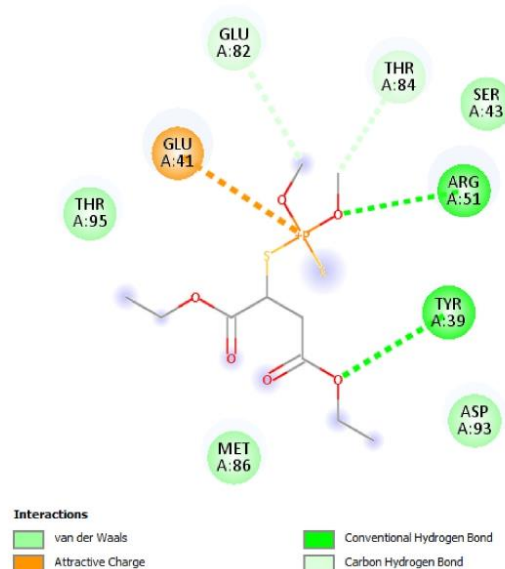


Fig. 4. Molecular interactions between the C2 domain of the cPLA2 protein from *Danio rerio* with the compound malathion. The interactions were represented in the Discovery software.

4.2. Molecular docking

The value of Gibbs free energy for malathion was $-5.4 \text{ kcal mol}^{-1}$, while for malaoxon the value was $-5.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Table 1). It can be seen that the insecticide in its synthetic state made a hydrogen bond with the alanine residue. On the other hand, results with malathion showed van der Waals interaction with the catalytic dyad residues (Ser 223 and Asp 540). Malaoxon establishes hydrophobic and van der Waals contact to the catalytic site residue of cPLA2 (Ser 223) (Fig. 3a–c).

The docking results exhibited interactions between the catalytic domain (C2) and the ligand with binding free energy of $-3.6 \text{ kcal mol}^{-1}$. It was possible to observe hydrogen bonds with arginine and tyrosine residues besides to van der Waals interactions with serine, aspartic acid and threonine residues (Fig. 4).

Organophosphorus compounds like malathion, malaoxon and paraoxon can indeed binding to cPLA2, however, the interaction of malathion or malaoxon are not stable in the catalytic dyad. Nonetheless, strong interactions occur close to the cPLA2 active site, which is Ala 569 in the case of malathion or with Ser 568 and Ala 569 of malaoxon. Epstein et al. (2009) reveals that it is possible to observe the complexes formation between PLA2 VIII enzyme and several organophosphate compounds. The interaction between residue histidine 195 and OPs promotes the protonation of this amino acid and proton abstraction from Ser together with the nucleophilic attack to paraoxon.

The water characteristics (pH, dissolved oxygen, luminosity, etc.) influences malathion degradation and it is related to the formation of its derivatives. Malaoxon is the most cited derivative in the literature, which was present in 75% of surface water samples (Duttagupta et al., 2020). Although several forms of malathion derivatives have already been detected through analytical methods, we selected malaoxon for our studies due to its abundance. In this sense, a cocktail of xenobiotics in water due to agriculture practices, pharmaceuticals and heavy metals could imply toxic effects in aquatic organisms. Docking experiments with cyclooxygenases 2 (COX-2) enzyme from *Danio rerio*, *Xenopus laevis*

and *Oncorhynchus mykiss* demonstrated strong relationship with diclofenac and ibuprofen (Walker and McEldowney, 2013). Also, using molecular docking and QSAR models, some authors investigated the bisphenols activity, flame retardants polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls acting as endocrine disrupting in human and rat androgen receptors (Yang et al., 2009, 2016; Li et al., 2013).

It is possible to notice that replacing the sulfur atom in the phosphate group of malathion with an oxygen atom dramatically changes the ability of the compound to interact with cPLA2 (Figs. 2 and 3). Paraoxon was able to interact with cPLA2 due to the presence of a nitrobenzoic group that is the same found in many phospholipases and esterases substrate (Toyama et al., 2022). This fact highlights that nitrobenzoic group can integrate with certain crucial amino acids such as serine, histidine and aspartic acid (Fig. 5). In this case, histidine seems to have an essential role in the complex between organophosphates and PLA2 formation (Epstein et al., 2009).

Phospholipase A2 inhibition or overstimulation can lead to several disorders, like AA accumulation. AA is the main metabolite generated during inflammation, which promotes damage to the circulatory system and a reactive oxygen species production. In addition, proinflammatory mediators are generated by the AA release (lysophospholipids, eicosanoids, platelet aggregation factor) related to diverse neurological disorders. Moreover, studies reveal that malathion and its analogues cause mutagenic effect and changes in DNA, besides their clastogenic and aneugenic effects, as well as neoplasms formation for both animals and humans (Rezapour-Firouzi, 2017; Bastos et al., 2020).

Changes in AA metabolism can trigger oxidative stress and develop reactive oxygen species (EROS) formation (Toyama et al., 2019). Acetylcholinesterase has an active site with a catalytic triad consisting of serine, glutamic acid, and histidine residues, which is also found in several other esterases, but in the case of cPLA2, the catalytic site consists of the ser-asp dyad. Hence, the histidine absence is crucial for the non-stabilization of malathion or its derivatives to the active site. In addition, malathion can damage the smooth endoplasmic reticulum through intracellular calcium influx. This increase in calcium concentration within the cell leads to the cPLA2 stimulation leading to membranes translocation (Bittova et al., 1999; Hsu et al., 2019).

5. Conclusion

Here, we demonstrate the theoretical interaction of malathion and its analogues with a protein (PLA2) that is a precursor of the inflammatory process that will contribute to innovative research. Malathion and its derivatives, such as malaoxon, are carboxylic acid esters and can potentially bind to the catalytic site of esterase and lipases. Future studies are needed to elucidate the modulation of cPLA2 enzymatic activity against malathion and its metabolites. Molecular docking experiments allows predicting possible biological changes in aquatic animals that can be useful to guide *in vitro* and *in vivo* tests.

Author contributions statement

A.M.: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; writing—original draft, preparation; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing – original draft; Writing – review & editing. B. P. D-C.: Conceptualization; Formal analysis; writing—original draft preparation; , Writing – review & editing. A. R.: Formal analysis; Validation; Writing – review & editing. L. L. F. M.: Formal analysis; Validation; Writing – review & editing. I. A.: Validation; Visualization; Writing – review & editing.. M. N. B.: Formal analysis; Validation; Writing – review & editing.. M. A. O.: Formal analysis; Investigation; Writing – review & editing; Supervision; Validation; M.H.T.: funding acquisition; Project administration; Formal analysis; writing—original. Draft preparation; Writing – review & editing.

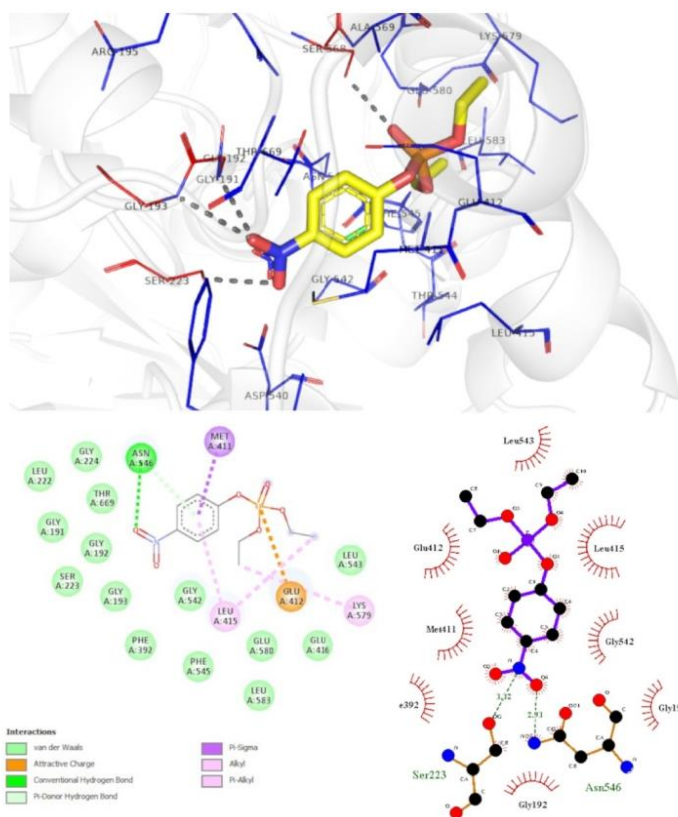


Fig. 5. Representation of organophosphate paraoxon interacting with cPLA2 from *Danio rerio* with emphasis in nitrobenzoic acid group and hydrogen bond with Ser223 (catalytic residue) and Asn546. These images were developed using Pymol, Discovery and LigPlot⁺ software.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

We thank the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support. M.H.T thanks FAPESP (proc.2017/20291-0) and CNPq (proc. 304153/2019-2) and L.A thanks FAPESP (Proc. 2021/03352-1) for research fellowships.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17), 3389–3402.

- Bastos, P.L., Bastos, A.F.T., de L.Gurgel, A. do M., Gurgel, I.G.D., 2020. Carcinogenicidade e mutagenicidade do malathion e seus dois análogos: uma revisão sistemática. *Ciência Saúde Coletiva* 25, 3273–3298.
- Bauer, T.L., Buchholz, P.C.F., Pleiss, J., 2020. The modular structure of α/β -hydrolases. *FEBS J.* 287, 1035–1053.
- Bittova, Lenka, Sumandea, Marius, Cho, Wonhwa, 1999. A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2: identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues. *J. Biol. Chem.* 274 (14), 9665–9672. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9665>. In this issue.
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50, S237–S242.
- Bavec, A., 2011. Structure, function and regulation of group IV phospholipase A2 family. *Acta Chim. Slov.* 58, 2.
- Calabrese, R., Capriotti, E., Fariselli, P., Martelli, P.L., Casadio, R., 2009. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum. Mutat.* 30 (8), 1237–1244.
- Capriles, P.V., Guimarães, A.C., Otto, T.D., Miranda, A.B., Dardenne, L.E., Degraive, M. W., 2010. Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: putative drug targets for chagas' disease treatment. *BMC Genom.* 11 (1), 1–10.
- Capriotti, E., Altman, R.B., 2011. Improving the prediction of disease-related variants using protein three-dimensional structure. *BMC Bioinf.* 12 (4), 1–11.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., et al., 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66 (1), 12–21.
- Clark, James D., Milona, Nina, Knopf, John L., 1990. Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A2 from the human monocytic cell line U937. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (19), 7708–7712.

- Dutta Gupta, S., Mukherjee, A., Bhattacharya, A., Bhattacharya, J., 2020. Wide exposure of persistent organic pollutants (PoPs) in natural waters and sediments of the densely populated Western Bengal basin, India. *Sci. Total Environ.* 717, 137187.
- Epstein, T.M., Samanta, U., Kirby, S.D., Cerasoli, D.M., Bahinso, B.J., 2009. Crystal structures of brain group-VIII phospholipase A2 in nonaged complexes with the organophosphorus nerve agents soman and sarin. *Biochemistry* 48, 3425–3435.
- Gijón, M.A., Spencer, D.M., Kaiser, A.L., Leslie, C.C., 1999. Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A2. *J. Cell Biol.* 145 (6), 1219–1232.
- Ghosh, M., Tucker, D.E., Burchett, S.A., Leslie, C.C., 2006. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog. Lipid Res.* 45 (6), 487–510.
- Huang, Q., Wu, Y., Qin, C., He, W., Wei, X., 2015. Phylogenetic and structural analysis of the phospholipase A2 gene family in vertebrates. *Int. J. Mol. Med.* 35 (3), 587–596.
- Hsu, S.S., Jan, C.R., Liang, W.Z., 2019. Uncovering malathion (an organophosphate insecticide) action on Ca²⁺ signal transduction and investigating the effects of BAPTA-AM (a cell-permeant Ca²⁺ chelator) on protective responses in glial cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 157, 152–160.
- Kim, O.T.P., Nguyen, P.T., Shoguchi, E., Hisata, K., Vo, T.T.B., Inoue, J., Shinzato, C., Le, B.T.N., Nishitsuji, K., Kanda, M., Nguyen, V.H., Nong, H.V., Satoh, N., 2018. A draft genome of the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, for comparative analysis of genes relevant to development and a resource for aquaculture improvement. *BMC Genom.* 19 (1), 1–16.
- Kumar, M., Sodhi, K., Ka, Singh, D.K., 2019. Bioremediation of Penicillin G by *Serratia* sp. R1, and enzymatic study through molecular docking. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 12, 100246.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Leslie, C.C., 2015. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* 56 (8), 1386–1402.
- Li, X., Ye, L., Wang, X., Shi, W., Liu, H., Qian, X., Zhu, Y., Yu, H., 2013. In silico investigations of anti-androgen activity of polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 92, 795–802.
- Meng, X.Y., Zhang, H.X., Mezei, M., Cui, M., 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 7 (2), 146–157.
- Murakami, Makoto, et al., 2015. A new era of secreted phospholipase A2. *J. Lipid Res.* 56 (7), 1248–1261.
- Petroianu, G., Helfrich, U., Schmitt, A., Bergler, W., Rüfer, R., 1997. Dose-dependent inhibition of phospholipase A2 by paraoxon in vitro: preliminary results. *J. Appl. Toxicol. Nov-Dec* 17 (6), 421–423.
- Pinzi, L., Rastelli, G., 2019. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (18), 4331.
- Rezapour-Firooz, S., 2017. Herbal oil supplement with hot-nature diet for multiple sclerosis. In: *Nutrition and Lifestyle in Neurological Autoimmune Diseases*. Elsevier, pp. 229–245.
- Santos Filho, O.A., Alencastro, R.B., 2003. Modelagem de proteínas por homologia. *Quim. Nova* 26, 253–259.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C., 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3381–3385.
- Sirisha, G.V.D., Vijaya Rachel, K., Zaveri, K., Yarla, N.S., Kiranmayi, P., Ganash, M., Alkreaty, H.M., Rajeh, N., Ashraf, G.M., 2018. Molecular docking and in vitro studies of soap nut trypsin inhibitor (SNTI) against phospholipase A2 isoforms in therapeutic intervention of inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Macromol.* 114, 556–564.
- Stahelin, R.V., 2016. Phospholipid catabolism. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, pp. 237–257.
- Tang, H., Wang, L., Chen, Y., He, J., Qu, L., Guo, Y., Liu, Y., Lin, H., 2017. Ovulation is associated with the LH-dependent induction of pla2g4a in zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 473, 53–60.
- Teske, L.P., 2019. Análise por simulação computacional de derivados teóricos da sibutramina. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Toyama, M.H., Rogero, A., de Moraes, L.L.F., Fernandes, G.A., da Cruz Costa, C.R., Belchor, M.N., De Carli, A.M., de Oliveira, M.A., 2022. Gallic acid as a non-selective inhibitor of α/β -Hydrolase fold enzymes involved in the inflammatory process: the two sides of the same coin. *Pharmaceutics* 14, 368.
- Toyama, M.H., Costa, C.R., Belchor, M.N., Novas, D.P., de Oliveira, M.A., le, R., et al., 2019. Edema induced by sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus* involves PLC and PKC signaling, activation of cPLA2, and oxidative stress. *Inflammation in the 21st Century* 37.
- Trott, O., Olson, A.J., 2009. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem. NA-NA*. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Walker, S.D., McElDowney, S., 2013. Molecular docking: a potential tool to aid ecotoxicity testing in environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Chemosphere* 93 (10), 2568–2577.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T., 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- Wu, B., Zhang, Y., Kong, J., Zhang, X., Cheng, S., 2009. In silico prediction of nuclear hormone receptors for organic pollutants by homology modeling and molecular docking. *Toxicol. Lett.* 191 (1), 69–73.
- Yang, W., Mu, Y., Giesy, J.P., Zhang, A., Yu, H., 2009. Anti-androgen activity of polybrominated diphenyl ethers determined by comparative molecular similarity indices and molecular docking. *Chemosphere* 75, 1159–1164.
- Yang, X., Liu, H., Yang, Q., Liu, J., Chen, J., Shi, L., 2016. Predicting anti-androgenic activity of bisphenols using molecular docking and quantitative structure-activity relationships. *Chemosphere* 163, 373–381.
- Zhou, L., Limbu, S.M., Shen, M., Zhai, W., Qiao, F., He, A., Du, Z.Y., Zhang, M., 2018. Environmental concentrations of antibiotics impair zebrafish gut health. *Environ. Pollut.* 235, 245–254.