



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PREDIÇÃO *IN SILICO* DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS À
TOXICIDADE DO DESENVOLVIMENTO DO ANTIPARASITÁRIO MOXIDECTINA
EM ORGANISMOS NÃO ALVO**

CLEYTON DE SOUSA GOMES

João Pessoa, PB

2024

CLEYTON DE SOUSA GOMES

**PREDIÇÃO *IN SILICO* DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS À
TOXICIDADE DO DESENVOLVIMENTO DO ANTIPARSITÁRIO MOXIDECTINA
EM ORGANISMOS NÃO ALVO**

Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias

Coorientador: Me. Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza

João Pessoa, PB
2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G633p Gomes, Cleyton de Sousa.

Predição in silico de alvos moleculares relacionados à toxicidade do desenvolvimento do antiparasitário moxidectina em organismos não alvo / Cleyton de Sousa Gomes. - João Pessoa, 2024.

70 p. : il.

Orientação: Davi Felipe Farias.

Coorientação: Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza.

TCC (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) - UFPB/CCEN.

1. Endectocida. 2. Contaminantes emergentes. 3. Lactona macrocíclica. 4. Toxicologia de rede. 5. γ -secretase e via NOTCH. 6. Biologia. I. Farias, Davi Felipe. II. Souza, Juliana Alves da Costa Ribeiro. III. Título.

UFPB/CCEN

CDU 57(043.2)

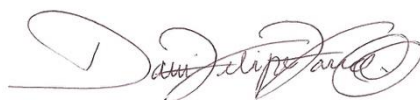
CLEYTON DE SOUSA GOMES

**PREDIÇÃO IN *SILICO* DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS À
TOXICIDADE DO DESENVOLVIMENTO DO ANTIPARSITÁRIO MOXIDECTINA
EM ORGANISMOS NÃO ALVO**

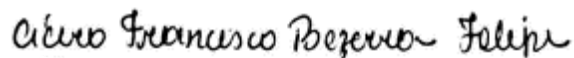
Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Data: 10 / 05 / 2024

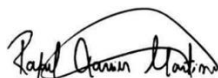
Resultado: Aprovado (10,0)



Orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Examinador I: Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Examinador II: Me. Rafael Xavier Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico à minha família e amigos, por todo amor.

AGRADECIMENTOS

Durante todo meu percurso dentro do curso de Ciências Biológicas, que totalizaram mais de 5 anos, sempre imaginei o momento no qual chegaria nessa tão importante etapa de conclusão, um passo que encerraria um grande ciclo na minha vida para que outros pudessem ser iniciados. Muitas foram as dificuldades que passei até aqui, mas igualmente muitas foram as pessoas que, junto a mim, trilharam o mesmo caminho ou me ajudaram a enfrentar todas as adversidades impostas pela vida, e a conquistar meus sonhos.

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha família. À minha avó materna, Rita Balduino da Silsa Sousa, essa mulher tão incrível que me criou desde pequeno e me ensinou muito sobre como ser uma pessoa digna.

À minha mãe, Edjania da Silva Sousa, mulher forte e de coração bondoso, que independente de tudo que acontecesse sempre esteve disposta a sacrificar qualquer coisa por mim, e também me ensinou sobre os caminhos dessa vida.

Ao meu pai, José Clébio Alves gomes, um exemplo de homem para mim, que sempre me ajudou de incontáveis formas, e me apoiou nos meus objetivos.

Aos meus irmãos Eryca Lourany, Daniel e Gabriel Alves, por todos os momentos, amor e carinho.

À Juliana dos Santos Barbosa, uma das pessoas mais importantes da minha vida, uma grande mulher, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais felizes e tristes da vida.

Aos meu tio Edjackson Sousa, e ao meu avô Raimundo Alves, pelo incontável apoio para que minha trajetória fosse possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Davi Felipe Farias, por todos os ensinamentos durante todo esse tempo no qual fiz parte do Laboratório de Avaliação de Riscos e Novas Tecnologias (LabRisco) e do programa de iniciação científica sob sua orientação. Agradeço também pela paciência e compreensão pelos meus erros e dificuldades durante toda minha trajetória acadêmica.

À minha coorientadora, Me. Juliana Alves Costa Ribeiro Souza, por todo o auxílio durante a construção deste trabalho, e por ser uma pessoa sempre solícita quando preciso.

Aos componentes da banca, por terem aceitado o convite de avaliar esse trabalho.

À equipe que compõe o Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias por todo o apoio e troca de experiências. Quero destacar meus agradecimentos ao Me. Rafael Xavier Martins, pela amizade e colaboração durante toda essa trajetória.

Aos meus amigos Erick Soares, Lucinaldo Cavalcante, Ana Santos, Heytor Mozart, Samuel Freire, Leo Coutinho e Clarice Maria, Kênia Gomes, Alcilene Ferreira e Luana Zapff por todas as risadas e momentos especiais que dividimos nessa jornada, muito obrigado!

Ao meu grande amigo Hugo Fernandes, pela amizade durante todos esses anos. Agradeço muitíssimo por todo o apoio, e as incontáveis horas de conversa que me ajudaram a enfrentar as adversidades da vida e a desenvolver minha paixão pela pesquisa científica.

Aos meus amigos da cidade de Catolé do Rocha e do Colégio Técnico Dom Vital (CTDV), pelos momentos especiais e apoio para que eu iniciasse minha trajetória na cidade de João Pessoa - PB.

À todas as outras pessoas da minha cidade natal e de João Pessoa que me auxiliaram de diferentes formas a conseguir me estabelecer e seguir meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Marcus Scotti do Laboratório de Quimioinformática da UFPB, pela parceria na realização de parte dos estudos *in silico*. Gostaria também de estender meus agradecimentos a duas integrantes do mesmo laboratório que me auxiliaram com essas metodologias, Mayara Maia e Natália Sousa.

Por fim, agradeço a Universidade Federal da Paraíba (UFPB), à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), por todo o apoio financeiro e institucional que tornaram possível o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

O Brasil é o maior exportador mundial de carne bovina e de frango e ocupa a segunda posição na produção desses alimentos, segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Assim, muitos são os produtos utilizados na manutenção desses animais, dentre eles, o endectocida moxidectina (MOX), que é usada no manejo permanente de carrapatos, piolhos e helmintos. Numa perspectiva ecotoxicológica, esses compostos podem adentrar o ambiente e causar danos a organismos não alvo, provocando danos individuais e/ou ecossistêmicos. Recentemente, foi mostrado que a MOX causa estresse oxidativo e atraso de eclosão em embriões de peixe-zebra, sinais de toxicidade do desenvolvimento (TD). Além disso, foi visto também o seu acúmulo na região da cabeça e dos olhos dos embriões, levando a hipótese de que a MOX poderia afetar o desenvolvimento do sistema nervoso. Nesse sentido, o presente trabalho buscou investigar o envolvimento da MOX com alvos e vias biológicas relacionadas à TD, através de abordagens *in silico*. Para tanto, foram usadas metodologias de toxicologia de rede para predição de alvos moleculares, e de “docking” e dinâmica molecular (DM) para analisar a interação do composto com os alvos triados. Os principais alvos encontrados foram componentes do complexo γ -secretase, um complexo proteico responsável pela ativação da via de sinalização Notch, que tem papel importante no desenvolvimento normal e no estabelecimento de processos fisiopatológicos no sistema nervoso. As simulações de “docking” atribuíram energias de ligação satisfatórias da MOX com as subunidades catalíticas da γ -secretase (PS1 e PS2). A DM mostrou que com o complexo alvo-MOX se manteve estável em ambiente que simula condições fisiológicas. Por fim, disfunção da sinalização celular e da regulação de proteínas com efeitos negativos sobre o desenvolvimento do sistema nervoso perfazem, pelo menos em parte, o modo de ação tóxico da MOX em embriões de peixe-zebra.

Palavras-chave: Endectocida, Contaminantes emergentes, toxicologia de rede, Lactona macrocíclica, γ -secretase e via NOTCH.

ABSTRACT

Brazil is the world's largest exporter of beef and chicken and ranks second in the production of these foods, according to the Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA). Thus, there are many products used in the maintenance of these animals, among them, the endectocide moxidectin (MOX), which is used in the permanent management of ticks, lice and helminths. From an ecotoxicological perspective, these compounds can enter the environment and cause damage to non-target organisms, causing individual and/or ecosystem damage. Recently, MOX was shown to cause oxidative stress and delayed hatching in zebrafish embryos, signs of developmental toxicity (DT). Furthermore, its accumulation was also seen in the head and eye region of embryos, leading to the hypothesis that MOX could affect the development of the nervous system. In this sense, the present work sought to investigate the involvement of MOX with biological targets and pathways related to DT, through *in silico* approaches. To this end, network toxicology methodologies were used to predict molecular targets, and molecular docking and dynamics were used to analyze the interaction of the compound with the screened targets. The main targets found were components of the γ -secretase complex, a protein complex responsible for activating the Notch signaling pathway, which plays an important role in normal development and in the establishment of pathophysiological processes in the nervous system. The docking simulations attributed satisfactory binding energies of moxidectin with the catalytic subunits of γ -secretase (PS1 and PS2). Molecular dynamics showed that the target-MOX complex remained stable in an environment that simulates physiological conditions. Finally, dysfunction of cell signaling and protein regulation with negative effects on the development of the nervous system make up, at least in part, the toxic mode of action of MOX in zebrafish embryos.

Keywords: Endectocidal, Emerging contaminants, Network toxicology, Macrocyclic lactone, γ -secretase and NOTCH pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos principais membros da família das lactonas macrocíclicas. À esquerda compostos pertencentes às milbemicinas e à direita componentes das avermectinas. Estruturas geradas na plataforma Marvin JS (<https://marvinjs-demo.chemaxon.com/latest/demo.html>).

Figura 2 - Distribuição espacial da moxidectina em embriões de peixe-zebra determinada com MALDI-MSi. A variação de cor representa o acúmulo do composto nos embriões. Medições pós-exposição estão indicadas à esquerda, enquanto na direita estão demonstrados os controles negativos.

Figura 3 - Fluxograma metodológico.

Figura 4 - Diagrama de Venn demonstrando a quantidade de alvos relacionados com a moxidectina (MOX - azul) e a toxicidade do desenvolvimento (TD - em vermelho). Na intersecção, os genes em comum.

Figura 5 - Rede de Interação Proteína-Proteína (IPP) da toxicidade do desenvolvimento induzida pelo antiparasitário de uso veterinário moxidectina. Cada “nó” (círculo) representa um gene e as linhas indicam a conexão entre eles. A mudança na cor está diretamente relacionada com o parâmetro de centralidade de intermediação (BC) e seus tamanhos representam o grau de conectividade (k).

Figura 6 - Top 10 alvos classificados por MCC no software Cytoscape 3.10.1. Quanto mais avermelhado o “nó” mais alto o valor do parâmetro usado.

Figura 7 - Resultados da análise das vias Reactome para os alvos da MOX relacionados com o efeito de toxicidade do desenvolvimento. O top 30 das vias baseado no p-valor estão expostas. O eixo X aponta a quantidade de genes, enquanto a transição de cores do vermelho para o azul indica a diminuição do p-valor.

Figura 8 - Resultados da análise das vias GO para os alvos da moxidectina relacionados com o efeito de toxicidade do desenvolvimento. O top 30 vias das categorias (A) processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular estão expostas baseado no p-valor. O eixo X, aponta a quantidade de genes,

enquanto a transição de cores do vermelho para o azul indica a diminuição do p-valor.

Figura 9 - (A) Gráficos 2D retratando as interações entre a MOX e resíduos de aminoácidos das subunidades catalíticas PS1 e PS2 do complexo γ -secretase. (B) Interação entre as proteínas citadas anteriormente e o padrão positivo MRK-560. Imagens produzidas no software Discovery Studio 2021.

Figura 10 - RMSD dos átomos de C α . (A) γ -secretase humana (PS1) (linha preta) complexada aos compostos MOX (linha vermelha) e MRK-560 (linha verde). (B) enzima γ -secretase (PS2) (linha preta) complexada ao antiparasitário MOX (linha vermelha) e padrão positivo MRK-560 (linha verde).

Figura 11 - RMSD dos átomos de C α dos compostos. (A) γ -secretase humana (PS1): MOX (linha vermelha) e MRK-560 (linha verde). (B) γ -secretase (PS2): MOX (linha vermelha) e padrão positivo (linha verde).

Figura 12 - RMSF dos átomos de C α dos complexos. (A) γ -secretase humana com a subunidade PS1 como sítio catalítico (linha preta) complexada aos compostos MOX (linha vermelha) e controle positivo MRK-560 (linha verde). (B) complexo γ -secretase contendo PS2 (linha preta) em complexo com o antiparasitário MOX (linha vermelha) e padrão positivo MRK-560 (linha verde).

Figura 13 - Raio de rotação (Rg). (A) γ -secretase humana (PS1) (linha preta) complexada com os compostos MOX (linha vermelha) e MRK-560 (linha verde). (B) enzima γ -secretase contendo PS2 (linha preta) e complexada aos compostos MOX (linha vermelha) e MRK-560 (linha verde).

Figura 14 - Proposta de modo de ação de toxicidade do desenvolvimento da moxidectina em embriões de peixe-zebra.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise das medidas topológicas da rede IPP da toxicidade do desenvolvimento induzida pelo antiparasitário de uso veterinário moxidectina, por meio da ferramenta Network Analyzer, presente no programa Cytoscape 3.10.1. k: grau; BC: “Betweenness Centrality”; CC²: “Closeness Centrality”; ASPL: “Average Shortest Pathway Length”.

Tabela 2 - Energias de ligação entre a MOX, o controle positivo e os sítios catalíticos do complexo γ -secretase, PS1 e PS2, em Kcal.mol⁻¹, usando o software Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0.

Tabela 3 - Afinidade de ligação entre a MOX, o controle positivo e os sítios catalíticos do complexo γ -secretase, PS1 e PS2, em Kcal.mol⁻¹, usando o software Autodock Vina (interface PyRx).

Tabela 4 - Valores de energia de interação Coulomb e Lennard-Jonnes.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: Porcentagem

2,4-D: Ácido Diclorofenoxiacético

Å: Angstrom

α: Alfa

β: Beta

γ: Gamma

ABN: Agropecuária Brasileira em Números

a.C.: Antes de Cristo

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APH1A: Faringe Anterior Defeituosa 1 Homólogo A

APH1B: Faringe Anterior Defeituosa 1 Homólogo B

ASPL: Comprimento Médio do Caminho mais Curto

BC: Centralidade de Intermediação

BP: Processo Biológico

CC¹: Componente Celular

CC²: Centralidade de proximidade

CE: Contaminantes Emergentes

CPE: Contaminantes de Preocupação Emergente

DA: Doença de Alzheimer

DDT: Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DEHP: Di(2-etilhexil) ftalato

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DM: Dinâmica Molecular

e.g.: *exempli gratia* (por exemplo)

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GABA_A: Receptor de ácido gama-aminobutírico do tipo A

GO: Ontologia Genética

hpf: Horas Pós-Fertilização

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IPP: Interação proteína-proteína

IVM: Ivermectina

K: Grau de conectividade

LMs: Lactonas Macrocíclicas

MAPA: Ministério da Agricultura e Pecuária

MCC: Centralidade de Clique Máximo

MOX: Moxidectina

MVD: Molegro Virtual Docker

nº: Número

NCSTN: Nicastrina

OMIM: Herança Mendeliana Online no Homem

PDB: Banco de Dados de Proteínas

PPA: Proteína Precursora da Amilóide

ps: Picossegundos

PS1/ PSEN1: Presenilina 1

PS2/ PSEN2: Presenilina 2

PSENE1: Potencializador de Presenilina

R\$: Reais

RNA: Ácido Ribonucleico

SARS-CoV-2: Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SDF: Arquivo de Dados Espaciais

Sindan: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal

TD: Toxicidade do desenvolvimento

UNIDO: Organização das Nações Unidas para o Desenvolvimento Industrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1. Ecotoxicologia: breve contexto histórico	19
2.2. O advento da agricultura e o controle de organismos indesejáveis	20
2.3. Contaminantes de Preocupação Emergente (CPE)	21
2.4. Medicamentos de uso veterinário no Brasil	23
2.4.1. Antiparasitários	24
2.4.2. Lactonas macrocíclicas: a moxidectina e seus impactos ambientais e à saúde humana	25
2.5. Metodologias <i>in silico</i> na predição de toxicidade	29
2.5.1. Toxicologia de rede	29
2.5.2. “Docking” e dinâmica moleculares	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. METODOLOGIA	33
4.1. Toxicologia de rede	34
4.1.1. Estrutura química da moxidectina e aquisição dos alvos moleculares	34
4.1.2. Diagrama de Venn e construção da rede de interação proteína-proteína (IPP)	34
4.1.3. Análise topológica da rede IPP	35
4.1.4. Análise de enriquecimento	36
4.2. “Docking” molecular	36
4.3. Dinâmica molecular	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Alvos da MOX relacionados com toxicidade do desenvolvimento	39
5.2. Análise das vias Reactome e GO	47
5.2.1. Análise das vias Reactome	47
5.2.2. Análise das vias GO	49

5.3. “Docking” molecular.....	52
5.4. Dinâmica molecular.....	55
5.4.1. Desvio quadrático médio (RMSD)	55
5.4.2. Flutuação quadrática média (RMSF) e Raio de rotação (RG).....	57
5.4.3. Energias de interação Coulomb e Lennard-Jones.....	59
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, é evidente um grande enfoque socioeconômico nas áreas agrícola e pecuária, com o país contando com um rebanho bovino que supera em número a própria população (IBGE, 2022). Nesse contexto, vários insumos e medicamentos são utilizados na manutenção deste rebanho, dentre eles, a moxidectina (MOX), um parasiticida bastante usado no manejo contínuo de carrapatos, piolhos e helmintos. Contudo, esses compostos podem apresentar efeitos indesejáveis ao atingirem o meio ambiente, causando danos a organismos não alvo (Fort Dodge Animal Health, 1997, Muniz *et al.*, 2021).

A MOX é um antiparasitário da classe das lactonas macrocíclicas (LMs), mesmo grupo químico no qual está a ivermectina (IVM), subgrupo das milbemicinas (Prichard; Ménez; Lespine, 2012). Ela é considerada, juntamente com outros compostos, um contaminante emergente (CE), que é definido como composto sintético ou de origem natural que não é regularmente monitorado no ambiente e possui potencial para causar prejuízos ecossistêmicos e/ou à saúde humana (Geissen *et al.*, 2015).

Embora a MOX no Brasil não seja devidamente regulamentada, em outros países, como é o caso da Irlanda, ela foi classificada como bioacumulativa e como uma substância de alto risco para ambientes aquáticos no cenário europeu (Kools *et al.*, 2008; Health Products Regulatory Authority, 2018). Nessa perspectiva, uma revisão recente apontou que vários estudos, com diferentes organismos e condições experimentais, vêm demonstrando que a MOX e outros representantes de sua classe (e.g. abamectina, ivermectina, eprinomectina e doramectina) desencadeiam efeitos categorizados como toxicidade do desenvolvimento (Muniz *et al.*, 2023).

Previamente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a MOX causa estresse oxidativo e atraso de eclosão em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio* com 96 horas pós fertilização, sinais que indicam toxicidade do desenvolvimento

(Muniz *et al.*, 2021). Além disso, o mesmo trabalho mostrou acúmulo desse antiparasitário na região da cabeça e dos olhos dos embriões, levando a hipótese de que a MOX pode potencialmente afetar o desenvolvimento e/ou funcionamento do sistema nervoso concentrado especialmente nessas regiões nessa fase de vida do peixe-zebra.

Além disso, com o transcorrer dos anos, cada vez mais produtos farmacêuticos como a MOX vêm sendo desenvolvidos, comercializados e utilizados de maneira negligente (Guo *et al.*, 2016). Assim, a preocupação acerca de novas rotas de contaminação ambiental e brechas no conhecimento sobre possíveis efeitos tóxicos e riscos à saúde têm crescido exponencialmente. Nesse viés, estudos ecotoxicológicos como o de Muniz *et al.* (2021) são impreteríveis na busca pela mitigação de danos e de uma compreensão mais profunda das possíveis consequências dos contaminantes emergentes.

Diante do grande número de produtos químicos produzidos pelas indústrias, o uso apenas de abordagens experimentais clássicas torna a tarefa de avaliar a toxicidade dos mesmos uma tarefa quase impossível devido a questões éticas, de tempo e econômicas (Kleandrova *et al.*, 2014). Para mitigar esta problemática, diversas metodologias *in silico*, como toxicologia de rede, “docking” e dinâmica molecular (DM), têm sido desenvolvidas, utilizando “softwares” para simular interações moleculares ou analisar as estruturas químicas buscando entender e/ou modificar suas funções, analisar suas relações com importantes vias moleculares, além de prever os possíveis efeitos de poluentes sobre os sistemas biológicos (Kleandrova *et al.*, 2014; Walker; Mceldowney, 2013).

Neste sentido, foi adotado no presente trabalho abordagens de toxicologia em rede, “docking” e DM moleculares com a finalidade de prever possíveis alvos moleculares de toxicidade do desenvolvimento relacionados à exposição de organismos não alvo ao antiparasitário moxidectina. Para tanto, foram utilizadas informações oriundas de *Homo sapiens* em virtude do grande volume de dados disponíveis para esta espécie nos bancos e da possibilidade de extrapolar os resultados obtidos para peixe-zebra em virtude da grande conservação de genes e vias biológicas entre as espécies.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Ecotoxicologia: breve contexto histórico

Para que haja uma melhor compreensão da importância de estudos como este e dos possíveis desdobramentos socioambientais consequentes, é útil contextualizar brevemente a ecotoxicologia - um dos ramos da ciência dedicado a compreender os aspectos e magnitude dos impactos de substâncias antropogênicas ou naturais para os ecossistemas e suas espécies (Moriarty, 1988; Belden, 2020).

Inicialmente, embora seja possível remontar os impactos nocivos da atividade humana no meio ambiente desde o desenvolvimento da civilização, há alguns milhares de anos, é durante a Revolução Industrial (século XVIII) que observamos um aumento significativo desses impactos (Hoffman *et al.*, 2002; Vighi; Villa, 2013). Neste período, a cultura humana mudou drasticamente em vários países, saindo de uma base econômica e cultural majoritariamente rural para converter-se em uma civilização urbana industrializada, em constante e rápido desenvolvimento. Com isto, a produção reduzida e manual foi substituída por um modelo em larga escala através do advento das fábricas e maquinários. Com o progressivo crescimento na produção, o uso de substâncias químicas, como combustíveis fósseis e produtos químicos industriais, também se intensificou, resultando no despejo de resíduos no ambiente sem que houvesse uma real compreensão dos seus riscos. A crescente poluição e degradação dos ambientes naturais despertaram preocupações acerca dos efeitos negativos dessas práticas no meio ambiente e na saúde humana (Fuller *et al.*, 2022).

No entanto, somente após a Segunda Guerra Mundial, com o desenvolvimento de uma variedade de produtos químicos sintéticos amplamente utilizados, em especial os pesticidas e outras substâncias agrícolas, que a ecotoxicologia consolidou-se como campo de estudo científico (Chapman, 2002). O termo “ecotoxicologia” foi cunhado pela primeira vez em 1969 pelo professor René Truhaut, um toxicologista francês, que definiu a área como a ciência que estuda os

efeitos tóxicos de vários agentes em organismos vivos, considerando as populações e comunidades dos ecossistemas (Truhaut, 1977). Antes mesmo da ecotoxicologia ser definida como um campo de estudo, preocupações ambientais já eram denunciadas publicamente por outros estudiosos. Em 1962, a bióloga e escritora norte americana Rachel Carson, publicou seu livro “Primavera Silenciosa”, alertando para os efeitos devastadores dos pesticidas na saúde animal e ambiental, com ênfase para o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) (Carson, 1962).

2.2. O advento da agricultura e o controle de organismos indesejáveis

No período em que os seres humanos adotavam um estilo de vida baseado na caça e coleta de recursos, a lista de vetores biológicos que os afetavam provavelmente não era extensa. É possível imaginar que os humanos dessa época enfrentavam problemas com moscas, mosquitos, pulgas e piolhos, e os métodos para lidar com estes, eram, provavelmente rudimentares. Entretanto, a partir do momento que a espécie humana constrói assentamentos e o desenvolvimento da agricultura e da criação de animais começam, aproximadamente 10 mil anos atrás, o cenário muda drasticamente (Flint; Bosch, 1981).

Inicialmente, as práticas de controle de organismos indesejados eram comumente baseadas em crenças e misticismo, como oferendas e outros ritos. Contudo, com o progresso tecnológico e do conhecimento, métodos que usavam substâncias naturais se tornaram mais comuns. Por exemplo, os sumérios, por volta de 2500 a.C., utilizavam compostos de enxofre no controle de insetos e ácaros. Em outro contexto, os chineses, por volta de 1200 a.C., desenvolveram inseticidas à base de plantas, usados no tratamento de sementes e fumigação (processo empregado também no combate a doenças). Além disso, esse mesmo povo aplicava cal e cinzas de madeira no solo para auxiliar no crescimento e proteção das plantações, técnicas estas usadas até os dias de hoje (Flint; Bosch, 1981).

Assim como na agricultura, a criação de animais trouxe diversos benefícios para a espécie humana. Eles eram usados na aquisição de alimentos como carne,

ovos e leite, assim como possuíam uma função central no transporte e manutenção das lavouras e estoques. No antigo Egito, o gado era venerado e vários deuses possuíam características físicas as quais remetiam a esses animais. Nessa perspectiva, o crescimento dos rebanhos levou ao aparecimento e disseminação de doenças (Schwabe, 1978; Doeschl-Wilson *et al.*, 2021). Para manter a saúde desses animais e tratar eventuais enfermidades, várias substâncias e procedimentos passaram a ser empregados. Na Índia, por exemplo, entre 2000 e 1000 a.C. escritos se referem ao uso de ervas, óleos, extratos de flores e frutos, bem como procedimentos cirúrgicos no tratamento animal (Somvanshi, 2006).

Ao longo dos séculos, os métodos de controle biológico sofreram uma ampla variação, embora alguns ainda persistam à passagem do tempo. No início do século XX, já havia um grande número de pessoas envolvidas no estudo e controle desses organismos. A entomologia, a parasitologia e as pesquisas acerca de patologias causadas por esses eram substanciais na época. As abordagens usadas iam desde estratégias de manejo até a aspersão e fumigação de compostos inorgânicos, como o arsenato de chumbo, um químico extremamente tóxico não apenas para insetos, mas também para humanos e outros animais (Flint; Bosch, 1981).

As pesquisas em controle biológico se mantiveram em um patamar estável durante as primeiro quatro décadas do século XX. Entretanto, pressões causadas pela Segunda Guerra Mundial (1939-1945) foram o estopim para uma grande revolução nesse campo. O desenvolvimento de uma série de compostos sintéticos, a exemplo do DDT, o qual foi majoritariamente usado como pesticida, mas também chegou a ser administrado na medicina veterinária (Flint; Bosch, 1981; Campbell, 1999; Zhang *et al.*, 2017).

2.3. Contaminantes de Preocupação Emergente (CPE)

Com o aumento exacerbado da população e, conseqüentemente, da demanda por produtos que supram todas as necessidades humanas (e.g.

agropecuária, construção, automobilística etc.), centenas de milhares de produtos químicos, das mais diversas origens, passaram a ser produzidos, utilizados e descartados (UNIDO, 2023). Dentre essas substâncias, um grupo específico ganhou destaque e foi denominado "contaminantes de preocupação emergente" (CPE), ou apenas "contaminantes emergentes". Nesse viés, estes químicos podem ser de origem natural ou antropogênica (humana) e frequentemente não são monitorados no ambiente ou sequer possuem regulamentação, podendo ser potencialmente tóxicos e apresentar riscos à saúde ecossistêmica e humana (Sauvé; Desrosiers, 2014; Aga, 2016; Nawaz; Taheran *et al.*, 2018; Sengupta, 2019; Noguera-Oviedo; Pompêo; Moschini-Carlos; López-Doval, 2022;). Os CPE podem ser encontrados em diversos ambientes, incluindo água, ar e solo (Khan *et al.*, 2022).

De acordo com Malule, Murillo e Manotas (2020) houve um aumento significativo na publicação de artigos sobre CPE no período de 2000 a 2019. Usando uma análise bibliográfica, os autores relataram a publicação de um total de 4968 artigos. Dentre os compostos mais estudados estavam os produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, organo-halogenados e agrotóxicos de maneira geral. Estes dados denotam um aumento significativo da preocupação da comunidade científica e de órgãos públicos com esses compostos.

Os componentes dessa classe de contaminantes incluem: produtos relacionados a cuidados pessoais (como cosméticos e produtos de higiene - e.g. triclosan), desreguladores endócrinos (como bisfenol-A), adoçantes artificiais (como sucralose), nanomateriais (como grafeno, nanoplástico), hormônios (como esteroides), fragrâncias, retardantes de chama (como hidróxido de alumínio), plastificantes (como DEHP), polímeros, toxinas de origem algal, surfactantes, agrotóxicos (como 2,4-D, atrazina, glifosato), medicamentos para uso humano e veterinário (como acetaminofeno e moxidectina), dentre outros agentes químicos (Lange *et al.*, 2012; Richardson, 2012; Richardson; Kimura, 2016; Khan *et al.*, 2022).

2.4. Medicamentos de uso veterinário no Brasil

No Brasil, a agropecuária representa atualmente o carro chefe da economia. O país sempre aparece na lista dos maiores produtores e exportadores dessa área. De acordo com dados do panorama da agropecuária brasileira disponibilizados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) de 2023/2024, o Brasil ocupou a segunda posição na produção mundial de carne bovina e de frango, e a quarta posição no que diz respeito à carne suína. No *ranking* de maiores exportadores mundiais, para o mesmo período, atingiu o primeiro lugar para as carnes bovina e de frango e o terceiro para a suína (MAPA, 2024). Considerando apenas o rebanho bovino, que totaliza cerca de 234 milhões de animais (ABN - agropecuária brasileira em números, 2024), número que supera a população humana brasileira (IBGE, 2022). Com isso, a necessidade de uma elevada produção e comercialização de medicamentos veterinários torna-se obrigatória, pois quanto mais indivíduos maior a probabilidade do surgimento e disseminação de doenças. Nessa perspectiva, o Brasil foi considerado como um dos cinco maiores mercados de medicamentos veterinários do mundo (Capanema *et al.*, 2007; Souza, 2021).

Os medicamentos veterinários são usados na prevenção e no tratamento de doenças, principalmente em animais de produção e em animais domésticos/de estimação. Esses medicamentos são divididos em classes e cada uma possui modos de ação distintos. Sua classificação é feita com base em sua natureza química e seus efeitos biológicos. Segundo Boxall *et al.* (2008), os grupos mais notáveis são: parasiticidas, antibióticos, antifúngicos, hormônios e promotores de crescimento. Em 2022, de acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal a indústria veterinária brasileira atingiu um faturamento líquido de R\$ 10,363 bilhões e como já era de se esperar as espécies com maior demanda foram os ruminantes, com uma parcela de 51% da receita (Sindan, 2022).

Os medicamentos veterinários passaram a ser regulamentados no Brasil a partir de 13 de fevereiro de 1969 com o Decreto-Lei nº 467 (BRASIL, 1969), o qual dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os produzem, dentre outras providências. Desde então, outros decretos e

portarias vieram de modo a alterar e/ou implementar as condições já previstas pelo decreto inicial (MAPA, 2023).

Essa regulamentação é de suma importância, pois os fármacos e seus metabólitos têm a capacidade de contaminar de forma direta e indireta os ecossistemas aquáticos e terrestres. A entrada desses produtos no ambiente pode ocorrer de várias formas a depender de sua composição química e modo de aplicação. A respeito da administração, essa pode ocorrer de múltiplas formas, dentre elas: oral, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intranasal e tópica. Uma vez adentrado o ambiente, esses químicos têm o potencial de acarretar uma série de efeitos não desejados a organismos não alvo (organismos os quais não eram o real alvo da aplicação - e.g. invertebrados e peixes). Esses impactos podem levar a alterações sutis a nível de indivíduo ou até mesmo ter uma repercussão em grau transgeracional e populacional, a qual têm a capacidade de desestruturar a cadeia trófica por inteiro (Oliveira *et al.*, 2009, Muniz *et al.*, 2023).

2.4.1. Antiparasitários

Dentre os medicamentos veterinários mais utilizados no Brasil e no mundo destacam-se os antiparasitários. Em 2021, os antiparasitários representaram a maior parcela do mercado global de cuidados com animais, totalizando de 34,1% (HeathforAnimals, 2022). Esses fármacos, como o próprio nome indica, são usados na profilaxia e tratamento de infecções causadas por parasitas. Eles podem ser subdivididos em dois grandes grupos: anti-helmínticos e antiprotozoários. Além disso, a localização do parasita no corpo do indivíduo também conta como critério classificatório, no qual há: ectoparasiticidas, endoparasiticidas e endectocidas, para o combate a parasitas externos, internos e ambos, respectivamente (Selzer; Epe, 2021).

As doenças causadas por parasitas são de importância global visto que afetam mais de 1 bilhão de pessoas (Campbell; Soman-Faulkner, 2019). Além disso, esses organismos representam um risco à produção animal e de alimentos.

No contexto brasileiro, de 2015 a 2021, os antiparasitários corresponderam a mais de 25% do mercado de medicamentos veterinários, detendo as maiores taxas de comercialização, prescrição e uso dentre as classes terapêuticas veterinárias (Sindan, 2022)

Recentemente, em 2019, com o surgimento e propagação da pandemia da COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2 e suas variantes, múltiplas drogas foram propostas visando seu tratamento, dentre elas uma causou muitas polêmicas e controvérsia: a ivermectina, um antiparasitário clássico e de extensa comercialização. O uso descontrolado desse medicamento durante a pandemia levou muitos grupos de pesquisa a investigarem os efeitos ecotoxicológicos não apenas da IVM, mas também de outros membros de sua classe (Farias *et al.*, 2020; Popp *et al.*, 2021).

2.4.2. Lactonas macrocíclicas: a moxidectina e seus impactos ambientais e à saúde humana

Quando se trata de antiparasitários é impreterível citar uma classe que revolucionou o tratamento dessas infecções, as lactonas macrocíclicas (Figura 1). As LMs são uma classe de químicos derivados do processo de fermentação realizado por bactérias de solo do gênero *Streptomyces* (Vercruyse; Rew, 2002). Essas bactérias foram observadas pela primeira vez pelo pesquisador Satoshi Omura e sua equipe, no Japão, na década de 1970 (Burg *et al.*, 1979). Em 1981, a IVM, primeira LM, foi lançada no mercado. Nesse contexto, essas substâncias compõem um grupo de compostos altamente hidrofóbicos e que possuem um amplo espectro de ação antiparasitária (Muniz *et al.*, 2021).

As LMs são subdivididas em 2 grupos, as avermectinas e as milbemicinas. As avermectinas compreendem abamectina, emamectina, doramectina, eprinomectina, selamectina e ivermectina, e as milbemicinas são nemadectina, milbemectina, milbemicina oxima e a moxidectina, a mais popular desse subgrupo. O uso das LMs é aprovado para diversas espécies, desde de animais de estimação a humanos (Molento, 2000; Vercruysse; Rew, 2002). Quanto ao mecanismo de ação, esses químicos têm efeito principalmente no sistema nervoso do parasita, aumentando o influxo de íons cloreto por meio de ligação com receptores GABA_A e canais regulados por glutamato. Essas interações levam a relaxamento muscular generalizado em invertebrados (Vercruysse; Rew, 2002). Segundo Menéz *et al.* (2012), a MOX e a IVM podem atuar também como moduladores alostéricos positivos para a resposta induzida por GABA.

Em termos de pesquisa, o número de artigos publicados em bancos de dados como PubMed e Science Direct com as avermectinas é bem maior que aqueles publicados com as milbemicinas. Por isso, se sabe relativamente pouco acerca dos efeitos tóxicos, sobretudo crônicos, das milbemicinas. Mesmo a MOX, que dispõe de maior destaque dentro da subclasse, carece de dados e de devida regulamentação em alguns países. No contexto brasileiro, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regula o limite máximo de resíduos da MOX e de outros medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, mas não possuem regulamentação e controle de seus níveis ambientais (ANVISA, 2018).

Em contrapartida, outros países, a exemplo da Irlanda, classificam a MOX como bioacumulativa e como uma substância com um alto risco de incidência em ambientes aquáticos no cenário europeu (Health Products Regulatory Authority, 2018; Kools *et al.*, 2008). Um estudo do nosso grupo de pesquisa confirmou o potencial tóxico e bioacumulativo do antiparasitário (Figura 2) (Muniz *et al.*, 2021). Além disso, outro artigo, mais recente, da mesma autora revisou os principais efeitos tóxicos das LMs encontrados na literatura. O estudo salientou o potencial desses químicos na alteração e inibição de crescimento em múltiplos táxons, diversas alterações comportamentais, reprodutivas, transcricionais e mortalidade (Muniz *et al.* 2023).

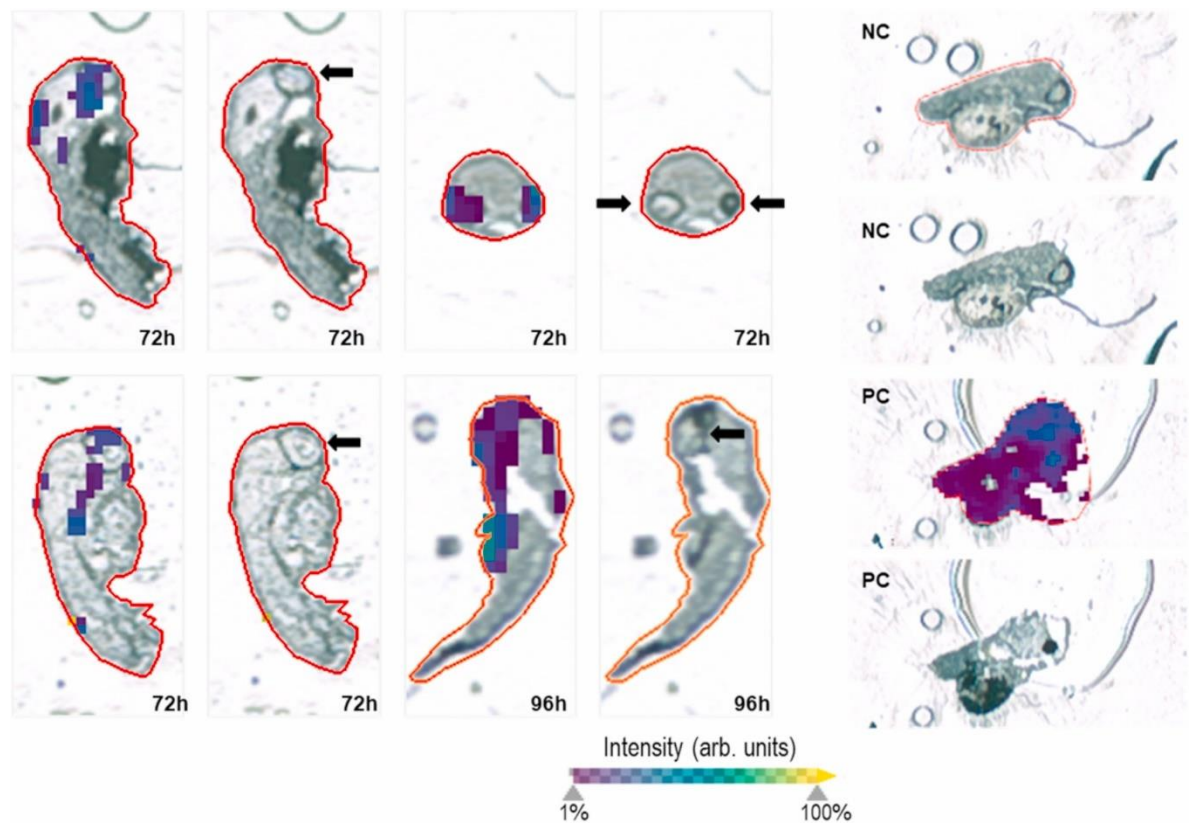


Figura 2. Distribuição espacial da moxidectina em embriões de peixe-zebra determinada com MALDI-MSi. A variação de cor representa o acúmulo do composto nos embriões. Medições pós-exposição estão indicadas à esquerda, enquanto na direita estão demonstrados os controles negativos.

Fonte: Muniz *et al.*, 2021

Recentemente, a MOX foi aprovada para o tratamento da oncocercose humana, doença parasitária causada pelo nematóide filarial *Onchocerca volvulus*, também conhecida como “cegueira do rio” (Milton *et al.*, 2020). A oncocercose é uma doença tropical negligenciada (DTN), que são doenças causadas por agentes infecciosos ou parasitas, endêmicas de populações com baixa renda (Fiocruz, 2024). A sua transmissão ocorre por meio de repetidas picadas de mosquitos pretos do gênero *Simolium* infectados com as larvas dos parasitas. Em testes clínicos, o

antiparasitário causou alguns efeitos adversos como dores de cabeça, coceira, irritação na pele, taquicardia e hipotensão ortostática (Milton *et al.*, 2020).

2.5. Metodologias *in silico* na predição de toxicidade

2.5.1. Toxicologia de rede

Quando a interação entre ligantes e alvos é ensinada nas aulas de cursos médios e superiores, comumente é utilizada a analogia da “chave e fechadura”, na qual uma molécula específica atua como uma “chave” única que encaixa em um dado alvo que seria considerado a “fechadura”. Nas últimas décadas, a busca por ligantes cada vez mais específicos, evitando interações com outros alvos e consequentes efeitos não desejados, tornou-se um grande paradigma no desenvolvimento de novas substâncias, principalmente medicamentos (Hopkins, 2007; Sun *et al.*, 2022). Entretanto, torna-se cada vez mais evidente que uma “chave” (ligante) pode encaixar em várias “fechaduras” (alvos), e que a princípio essa interação é muito mais comum do que se pensava (Yildirim *et al.*, 2007; Qing *et al.*, 2020). Nesse contexto, as abordagens da biologia de redes se apresentam como uma excelente alternativa para a análise das interações diferentes possíveis entre moléculas.

Uma das abordagens da biologia de redes, a qual vem ganhando reconhecimento, é a toxicologia de rede. Segundo Zhang (2016), a toxicologia de rede é uma área de estudo interdisciplinar que reúne um grupo de métodos *in silico* que buscam compreender os efeitos danosos de substâncias tóxicas aos sistemas biológicos, por meio de uma perspectiva de redes, avaliando interações moleculares, assim como mecanismos de ação e vias de sinalização. Através de bancos de dados, sites e softwares, os quais conseguem simular centenas ou até milhares de conexões simultâneas, torna-se mais simples a tarefa de escolher as melhores moléculas para posteriores testes *in vitro* ou *in vivo*, poupando vidas animais, tempo e recursos.

2.5.2. “Docking” e dinâmica moleculares

O “docking” molecular ou ancoragem é uma ferramenta que vem ganhando notoriedade nas últimas décadas impulsionada pelas demandas da biologia molecular estrutural e do desenvolvimento de medicamentos (Gill *et al.*, 2016). O avanço computacional e de acesso a bancos de dados têm lançado bases para seu crescimento e popularização. Nessa técnica, geralmente se usa uma molécula pequena como ligante e uma macromolécula alvo. Entretanto, o “docking” pode ser realizado também entre moléculas grandes como é o caso das interações proteína-proteína ou até mesmo com DNA (ácido desoxirribonucleico) ou RNA (ácido ribonucleico (Morris, 2008; Stanzione; Giangreco; Cole, 2021). De modo geral, o processo consiste em posicionar um ligante no sítio ativo de uma proteína ou em outra parte de interesse da estrutura, e encontrar a melhor orientação do ligante, o qual irá formar um complexo com o mínimo de energia global (Stanzione; Giangreco; Cole, 2021). Os ensaios de “docking” molecular compreendem a avaliação dos resultados de afinidade de ligação das melhores conformações a partir de diferentes funções de pontuação e/ou diferentes programas de docking. Este tipo de análise contribui para reduzir o número de falsos positivos e aumentar a probabilidade de acertos (Stanzione; Giangreco; Cole, 2021).

Como citado anteriormente, as simulações podem ser realizadas em vários programas distintos, os quais geralmente possuem algoritmos e funções de pontuação diferentes, por isso a importância do uso de mais de um programa para diminuir a probabilidade de incongruências. Contudo, os programas enfrentam um problema com a flexibilidade das estruturas. As proteínas, de modo geral, não são estruturas rígidas, possuindo partes mais e menos móveis. Os programas lidam com isso de diferentes maneiras. Alguns deles realizam apenas “dockings” rígidos, outros semiflexíveis e outros totalmente flexíveis (Fan; Fu; Zhang, 2019). Alterando a mobilidade de uma estrutura, também podem ser alterados os resultados. Proporcionalmente, quanto mais flexível for a estrutura, maior o custo computacional. Desse modo, a flexibilidade continua sendo um desafio para os pesquisadores (Fan; Fu; Zhang, 2019).

Além disso, outra preocupação que limita essa abordagem é a exclusão de moléculas de água, cofatores, entre outros, os quais podem estabelecer interações entre o receptor e o ligante. Para superar esta limitação, uma estratégia bastante aceita na investigação do mecanismo de ação e melhores conformações dos compostos são as simulações de dinâmica molecular (DM). Fundamentalmente, DM é um método *in silico* que estuda o movimento dos átomos e moléculas, usando como base as equações de movimento de Newton. A abordagem tenta estimar a flexibilidade das interações entre proteínas e ligantes diante de parâmetros que simulam condições fisiológicas, como temperatura, pressão, solventes e íons (Bermudez *et al.*, 2016; Hollingsworth; Dror, 2018).

Nessa perspectiva, as abordagens computacionais são valiosos métodos para a realização de trabalhos como este, pois, tornam possível a triagem de inúmeros dados biológicos sem a necessidade de sofrimento animal, com utilização de baixo custo financeiro e humano, além de manter padrões de confiabilidade científica e reprodutibilidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Predizer, por metodologias *in silico*, alvos moleculares associados à toxicidade do desenvolvimento do antiparasitário moxidectina em organismos não alvo.

3.2. Objetivos específicos

- Selecionar em bancos de dados alvos moleculares estruturalmente associados à moxidectina, bem como alvos associados à toxicidade do desenvolvimento.
- Elucidar as principais funções biológicas afetadas pela interação da moxidectina.
- Avaliar a viabilidade da interação da moxidectina com os alvos selecionados.

4. METODOLOGIA

Na metodologia empregada, foram utilizadas ferramentas de Toxicologia de Rede (NP, do inglês “Network Toxicology”), para investigar os possíveis alvos da moxidectina, assim como sua correlação com proteínas e vias associados à toxicidade do desenvolvimento, baseando-se e adaptando a metodologia de Souza *et al.* 2023. Além disso, foi avaliada a viabilidade de interação entre a MOX e os alvos encontrados, através do “docking” e DM, conforme ilustrado no esquema apresentado na Figura 3.

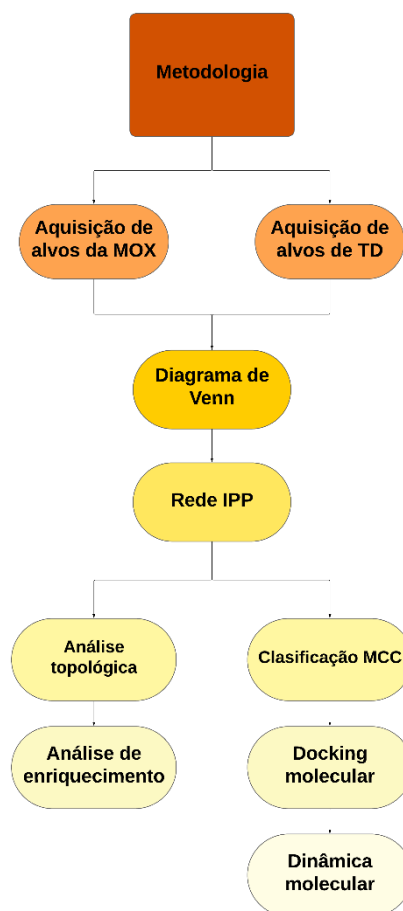


Figura 3. Fluxograma metodológico.

Nota: MOX: Moxidectina; TD: Toxicidade do Desenvolvimento; IPP: Interação Proteína-Proteína; MCC: “Maximal Clique Centrality”

4.1. Toxicologia de rede

4.1.1. Estrutura química da moxidectina e aquisição dos alvos moleculares

A estrutura química 2D da MOX foi obtida através do banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em seguida, essa estrutura foi submetida a base de dados Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) para a predição de genes relacionados.

Os alvos referentes a toxicidade do desenvolvimento foram obtidos, utilizando as palavras-chave “development toxicity” e “developmental toxicity” nos bancos de dados GeneCards (<https://www.genecards.org/>) e Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <http://omim.org/>), respectivamente. Usando a espécie *Homo sapiens* como referência na busca. Os nomes dos genes foram padronizados utilizando a base de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Após a união dos alvos da TD de ambas as bases, as duplicatas foram excluídas. As análises foram realizadas no período de 19 de fevereiro a 19 de março de 2024.

4.1.2. Diagrama de Venn e construção da rede de interação proteína-proteína (IPP)

Para identificar a intersecção entre os genes relacionados a MOX e à toxicidade do desenvolvimento, foi criado um diagrama de Venn usando a ferramenta Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Os alvos em comum foram inseridos na base de dados STRING (<https://string-db.org/>) para a construção da rede de interação proteína-proteína (IPP). O score mínimo foi definido como 0.7, que traz um alto nível de confiabilidade, e apenas dados de experimentos foram utilizados como fonte de interações ativas. A IPP realiza a análise de interações diretas entre a lista de alvos adicionados e gera uma rede na qual as proteínas são

representadas como “nós” e a interação entre elas como linhas as quais as conectam.

4.1.3. Análise topológica da rede IPP

A rede IPP foi importada para o programa Cytoscape 3.10.1. Em sequência, foi usada a extensão cytoHubba para ranquear os 10 “nós” (top 10) baseado no parâmetro MCC (do inglês “Maximal Clique Centrality”). Basicamente, o MCC refere-se à importância de um nó o qual está inserido em um grupo de nós, completamente interligados, em relação aos outros (Meghanathan, 2016). Além disso, foi usada a ferramenta de análise de redes para as análises topológicas, incluindo as variáveis grau (k), coeficiente de agrupamento, centralidade de proximidade (CC^2 , do inglês “Closeness Centrality”), centralidade de intermediação (BC, do inglês “Betweenness Centrality”) e comprimento médio do caminho mais curto (ASPL, do inglês “Average Shortest Pathway Length”).

O grau ou k designa a quantidade de conexões que um nó forma com outros dentro de uma rede. Quanto mais alto o k, maior o número ligações. Os nós com grau mais alto são importantes na transmissão de informações dentro das redes. O coeficiente de agrupamento mede o grau de densidade dos grupos de nós. Já o CC^2 , indica quantos vizinhos diretos de um nó estão interconectados, apontando aqueles que espalham a informação de forma mais eficiente. Por outro lado, o BC mensura a capacidade de um nó em conectar outros. Um alto BC, sugere nós importantes no estabelecimento de pontes entre diferentes partes das redes, atuando na transmissão e controle do fluxo de informações. Por fim, a medida ASPL determina o comprimento médio do caminho mais curto de um nó em relação a todos os outros (Souza *et al.*, 2023). As análises descritas acima foram desenvolvidas no período de 19 de março a 15 de abril de 2024.

4.1.4. Análise de enriquecimento

A análise de enriquecimento é um método da biologia computacional aplicada na identificação de funções biológicas que estão “super representadas” em um grupo de genes, mais do que deveriam estar normalmente, e as classifica por relevância (Chicco; Agapito, 2022). Para essa análise foi utilizada a base de dados Consensus PathDB (<http://cpdb.molgen.mpg.de/>). Foram empregadas duas abordagens de enriquecimento, Gene Ontology (GO) e Reactome. No GO, foram usadas as categorias Processo Biológico (BP, do inglês “Biological Process”), Função Molecular (MF, do inglês “Molecular Function”) e Componente Celular (CC¹, do inglês “Cellular Component”). Foram considerados estatisticamente significativas as vias Reactome e termos GO com *p-valor* < 0,01. Os 15 primeiros termos GO para BP, MF e CC¹ foram escolhidos, assim como o top 30 das vias Reactome. Os gráficos foram gerados usando R, através do pacote ggplot2.

4.2. “Docking” molecular

A interação entre os 6 primeiros alvos na rede IPP que apresentaram melhor resultado na classificação por MCC e a MOX foi avaliada por “docking” molecular. O principal motivo para a escolha dessa quantidade em específico é devido ao fato de todos eles serem constituintes do mesmo complexo proteico - γ -Secretase. Os passos metodológicos seguiram o seguinte fluxo:

I - Obtenção dos ligantes: a estrutura 3D da MOX (CID: 9832912) e do controle positivo MRK-560 (CID: 11577204) foram obtidas na base de dados PubChem, ambos em formato SDF (“Spatial Data File”).

II - Obtenção e preparação das macromoléculas: foram baixados dois complexos γ -secretase do PDB (“Protein Data Bank”), um possuindo a subunidade catalítica Presenilina 1 (PS1) e outro com a subunidade Presenilina 2 (PS2), referenciados pelos códigos 6IYC e 7Y5X, respectivamente. Consecutivamente, as proteínas foram encaminhadas para o programa Discovery Studio 2021, onde foram

removidas as moléculas de água e ligantes desnecessários, além de serem adicionadas ligações de hidrogênio polares. Após isso, a energia global foi minimizada no programa Swiss-PdbViewer 4.1.0 (<https://spdbv.unil.ch/>).

III - As simulações de *docking* molecular foram efetuadas em dois programas, o Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0 e o Autodock Vina (interface PyRx). No MVD as macromoléculas passaram por ajustes na protonação nos aminoácidos que necessitavam. As dimensões da “grid box” foram definidas como 20x20x20 Å em ambos os programas. Pelo fato de todas as proteínas de interesse fazerem parte do mesmo complexo proteico e apresentarem sua função biológica nessa condição, optou-se por usar durante as simulações apenas o sítio ativo do complexo formado, o qual encontra-se na PS1 e PS2.

IV - A avaliação das interações entre os resíduos de aminoácido dos alvos com os ligantes e geração das imagens se sucederam no Discovery Studio 2021.

4.3. Dinâmica molecular

As simulações de DM foram realizadas para estimar a flexibilidade das interações entre proteínas e ligantes, usando o software GROMACS 5.0 (Programa Horizon 2020 da União Europeia, Suécia) (Berendsen; Spoel; Drunen, 1995; Abraham et al., 2015). Para a preparação das topologias das proteínas e ligantes foi usado o campo de força GROMOS96 54a7.

A simulação DM foi realizada utilizando o modelo de água SPC de carga pontual, estendido em uma caixa cúbica (Bondi, 1994). O sistema foi neutralizado pela adição de íons (Cl⁻ e Na⁺) e minimizado para remover maus contatos entre moléculas complexas e o solvente. O sistema foi balanceado a 300 K, usando o algoritmo V-rescale de 100 ps (picossegundos), representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido de equilíbrio a 1 atm (atmosfera) de pressão, com o algoritmo de Parrinello-Rahman como o NPT (partículas de pressão e temperatura constantes), até 100 ps. As simulações de DM foram realizadas em 50.000.000 passos, a 100 ns (nanossegundos).

Para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável próximo à estrutura experimental, os valores de RMSD (Desvio Quadrático Médio) de todos os átomos de C α foram calculados em relação às estruturas iniciais. Também foram analisados os valores de RMSF (Raiz Quadrada da Flutuação Quadrática Média), com o objetivo de compreender os papéis desempenhados pelos resíduos próximos ao sítio de ligação do receptor. O RMSD analisa a distância média entre os átomos de C α de uma estrutura, quando a linha do gráfico sobe, significa que houve um distanciamento entre os átomos analisados, e quando ela desce esses átomos estão mais próximos uns dos outros. Já RMSF mensura a flexibilidade dos resíduos de aminoácido das estruturas investigadas durante a simulação. Os gráficos RMSD e RMSF foram construídos no software Grace (Grace Development Team, <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) (Nachbagauer et al., 2021).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Alvos da MOX relacionados com toxicidade do desenvolvimento

Após a padronização no UniProt e remoção de duplicatas, foram encontrados 1003 genes através do Swiss Target Prediction relacionados com a MOX e 9530 provenientes do GeneCards e OMIM para toxicidade do desenvolvimento. No diagrama de Venn, a intersecção resultou em 102 alvos em comum entre a MOX e a toxicidade do desenvolvimento (Figura 4), que foram usados para construir a rede de IPP na plataforma STRING. Os resultados foram levados ao Cytoscape para serem visualizados e analisados.

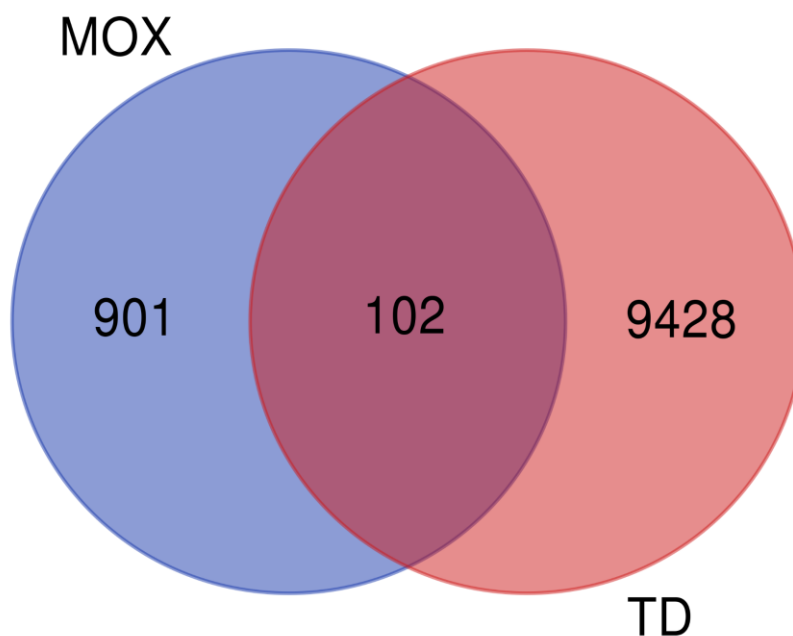


Figura 4. Diagrama de Venn demonstrando a quantidade de alvos relacionados com a moxidectina (MOX - em azul) e a toxicidade do desenvolvimento (TD - em vermelho). Na intersecção, os genes em comum.

De acordo com a análise realizada pelo programa, a rede IPP era formada por 52 nós e 70 conexões entre eles (Figura 5). Após isso, foi executada a análise topológica da rede com a ferramenta Network Analyzer, e os dados resultantes estão expostos na Tabela 1. Dentre os 10 alvos identificados como os principais nós pelo método MCC, 6 se destacaram por serem componentes de um mesmo complexo proteico, a γ -secretase. Sendo esses: Nicastrina (NCSTN), Presenilina 1 (PSEN1), Presenilina 2 (PSEN2), Potencializador de Presenilina (PSENEN), Aph-1 homólogo A e Aph-1 homólogo B (Figura 6). Além destes, PSMB5 e 8 (subunidades do proteassoma S20), HSP90AA1 (Proteína de Choque Térmico 90-Alfa Classe A membro 1) e GRB2 (Proteína 2 Ligada ao Receptor de Fator de Crescimento), também estão ilustrados (Figura 6).

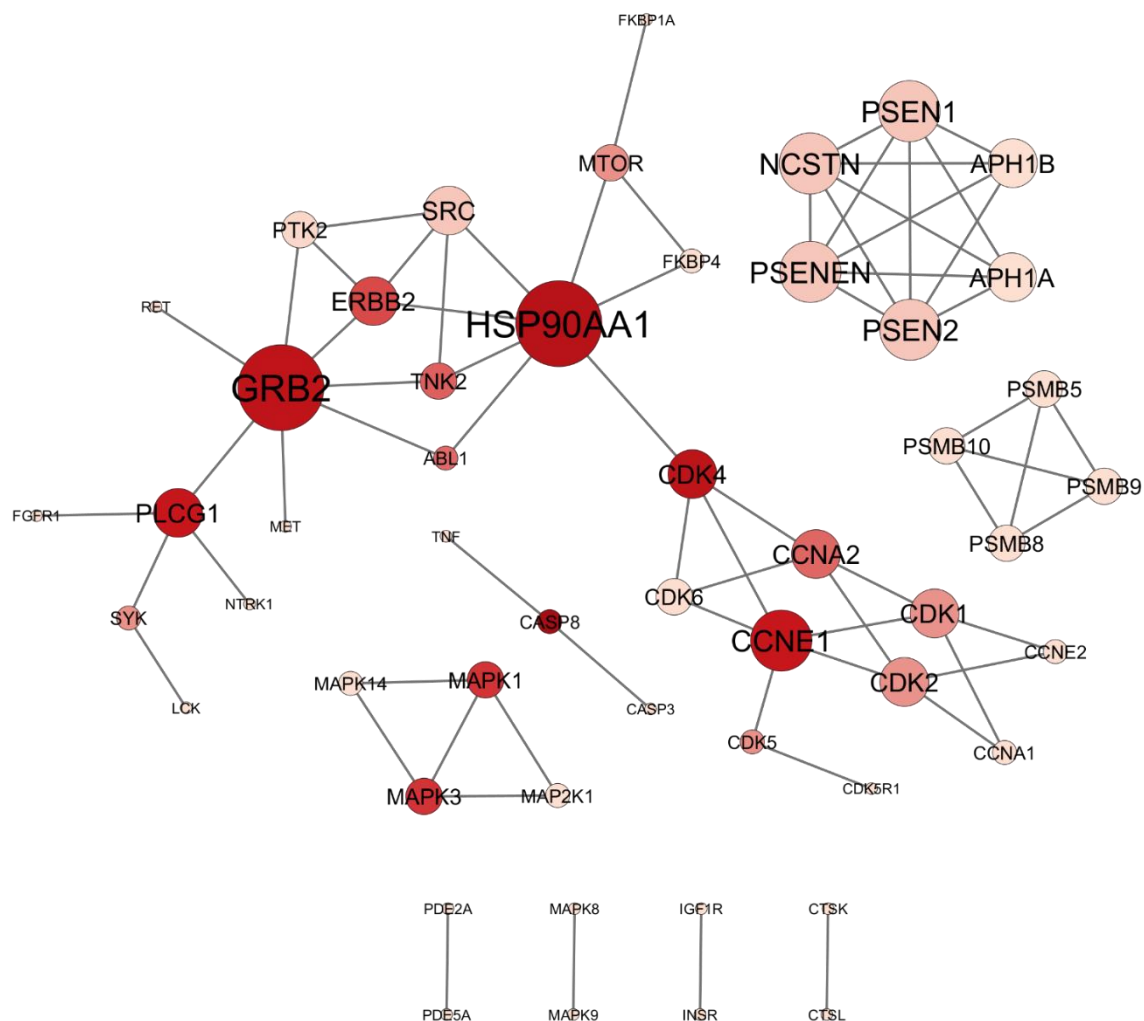


Figura 5. Rede de Interação Proteína-Proteína (IPP) da toxicidade do desenvolvimento induzida pelo antiparasitário de uso veterinário moxidectina. Cada “nó” (círculo) representa um gene e as linhas indicam a conexão entre eles. A mudança na cor está diretamente relacionada com o parâmetro de centralidade de intermediação (BC) e seus tamanhos representam o grau de conectividade (k).

Tabela 1. Análise das medidas topológicas da rede IPP da toxicidade do desenvolvimento induzida pelo antiparasitário de uso veterinário moxidectina, por meio da ferramenta Network Analyzer presente no programa Cytoscape 3.10.1. k: grau; BC: “Betweenness Centrality”; CC²: “Closeness Centrality”; ASPL: “Average Shortest Pathway Length”.

Proteína	Nó	k	Coefficiente de agrupamento	ASPL	BC	CC
ABL Proto-Oncogene 1	ABL1	2	0,0000	2,8462	0,1149	0,3514
Proteína de Choque Térmico 90 Alpha classe A membro 1	HSP90AA1	7	0,1429	2,5385	0,6195	0,3939
Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2	GRB2	7	0,0476	3,0000	0,4518	0,3333
Aph-1 Homóloga A, subunidade gamma-Secretase	APH1A	4	1,0000	1,2000	0,0000	0,8333
Nicastrina	NCSTN	5	0,9000	1,0000	0,0250	1,0000
Presenilina 1	PSEN1	5	0,9000	1,0000	0,0250	1,0000
Presenilina 2	PSEN2	5	0,9000	1,0000	0,0250	1,0000
Potenciador de Presenilina, subunidade gamma-Secretase	PSENE1	5	0,9000	1,0000	0,0250	1,0000
Aph-1 Homóloga B, subunidade gamma-Secretase	APH1B	4	1,0000	1,2000	0,0000	0,8333
Caspase 3	CASP3	1	0,0000	1,5000	0,0000	0,6667
Caspase 8	CASP8	2	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Fator de Necrose Tumoral	TNF	1	0,0000	1,5000	0,0000	0,6667
Ciclina A1	CCNA1	2	0,0000	4,8846	0,0007	0,2047
Cinase Dependente de Ciclina 2	CDK2	4	0,0000	4,0000	0,0746	0,2500
Cinase Dependente de Ciclina 1	CDK1	4	0,0000	4,0000	0,0746	0,2500
Ciclina A2	CCNA2	4	0,1667	3,4231	0,1177	0,2921
Cinase Dependente de Ciclina 4	CDK4	4	0,3333	2,8077	0,4731	0,3562

Proteína	Nó	k	Coefficiente de agrupamento	ASPL	BC	CC
Cinase Dependente de Ciclina 6	CDK6	3	0,6667	3,4615	0,0023	0,2889
Ciclina E1	CCNE1	5	0,1000	3,2692	0,2654	0,3059
Cinase Dependente de Ciclina 5	CDK5	2	0,0000	4,1538	0,0769	0,2407
Ciclina E2	CCNE2	2	0,0000	4,8846	0,0007	0,2047
Subunidade reguladora 1 da cinase 5 dependente de ciclina	CDK5R1	1	0,0000	5,1154	0,0000	0,1955
Catepsina K	CTSK	1	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Catepsina L	CTSL	1	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Receptor Tirosina cinase Erb-B2	ERBB2	4	0,5000	2,7692	0,1446	0,3611
Proteína Tirosina cinase 2	PTK2	3	0,6667	3,3077	0,0082	0,3023
SRC Proto-Oncogene	SRC	4	0,5000	3,0385	0,0241	0,3291
Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos 1	FGFR1	1	0,0000	4,6154	0,0000	0,2167
Fosfolipase C Gamma 1	PLCG1	4	0,0000	3,6538	0,2862	0,2737
FKBP Prolil Isomerase 1A	FKBP1A	1	0,0000	4,3462	0,0000	0,2301
Alvo Mecanístico da Rapamicina Cinase	MTOR	3	0,3333	3,3846	0,0769	0,2955
FKBP Prolil Isomerase 4	FKBP4	2	1,0000	3,4231	0,0000	0,2921
MET Proto-Oncogene	MET	1	0,0000	3,9615	0,0000	0,2524
Ret Proto-Oncogene	RET	1	0,0000	3,9615	0,0000	0,2524
Tirosina Cinase Não Receptora 2	TNK2	3	0,3333	2,8077	0,1231	0,3562
Receptor do Fator de Crescimento 1 Semelhante à Insulina	IGF1R	1	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Receptor de Insulina	INSR	1	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
LCK Proto-Oncogene, da família da Tirosina Cinase SRC	LCK	1	0,0000	5,5000	0,0000	0,1818

Proteína	Nó	k	Coefficiente de agrupamento	ASPL	BC	CC
Tirosina Cinase Associada ao Baço	SYK	2	0,0000	4,5385	0,0769	0,2203
Proteína Cinase Cinase 1 Ativada por Mitógeno	MAP2K1	2	1,0000	1,3333	0,0000	0,7500
Proteína Cinase 1 Ativada por Mitógeno	MAPK1	3	0,6667	1,0000	0,1667	1,0000
Proteína Cinase 3 Ativada por Mitógeno	MAPK3	3	0,6667	1,0000	0,1667	1,0000
Proteína Cinase 14 Ativada por Mitógeno	MAPK14	2	1,0000	1,3333	0,0000	0,7500
Proteína Cinase 8 Ativada por Mitógeno	MAPK8	1	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Proteína Cinase 9 Ativada por Mitógeno	MAPK9	1	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Receptor Neurotrófico Tirosina Cinase 1	NTRK1	1	0,0000	4,6154	0,0000	0,2167
Fosfodiesterase 2A	PDE2A	1	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Fosfodiesterase 5A	PDE5A	1	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Subunidade Beta 10 do Proteassoma 20S	PSMB10	3	1,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Subunidade Beta 5 do Proteassoma 20S	PSMB5	3	1,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Subunidade Beta 8 do Proteassoma 20S	PSMB8	3	1,0000	1,0000	0,0000	1,0000
Subunidade Beta 9 do Proteassoma 20S	PSMB9	3	1,0000	1,0000	0,0000	1,0000

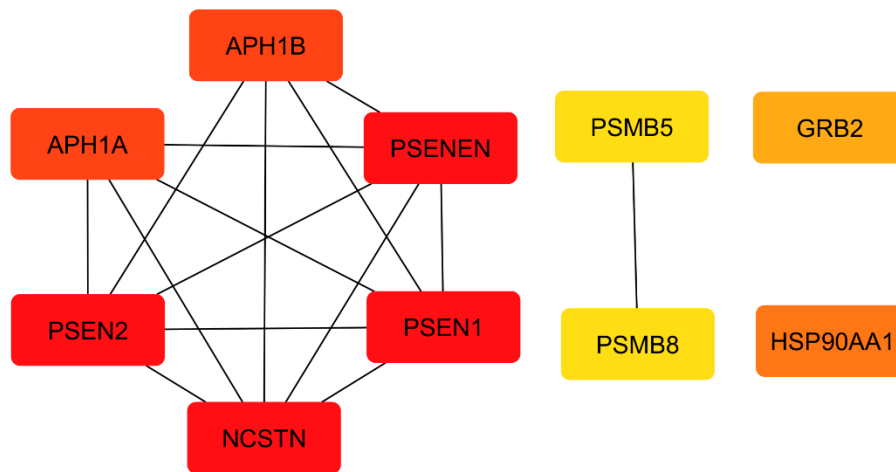


Figura 6. Top 10 alvos classificados por MCC no software Cytoscape 3.10.1. Quanto mais avermelhado for o “nó” mais alto o valor do parâmetro usado.

A γ -secretase é um complexo protease transmembranar, com a PS1 ou PS2 como sítio catalítico responsável pelo processo de proteólise de importantes substratos: Proteína Precursora da Amilóide (PPA) e receptores da família Notch (Battarai *et al.*, 2020). A PPA é clivada na parte externa da membrana plasmática pela β -secretase e, em seguida, pela γ -secretase, dando origem a peptídeos β -amiloides. A agregação desses peptídeos no cérebro, formando placas, é uma das principais características patológicas que definem a Doença de Alzheimer (DA) (Hur, 2022; Yang *et al.*, 2021).

Já o Notch, foi inicialmente estudado e nomeado em *Drosophila melanogaster* com asas entalhadas (do inglês, “Notched wings”) na década de 1910. A partir daí, homólogos do gene foram identificados em vários metazoários, com suas vias de sinalização, evolutivamente, muito conservadas. Em mamíferos, esse gene é transcrito em 4 glicoproteínas transmembranares (Tyagi; Sharma; Damodaran, 2020). Os receptores Notch passam por 3 clivagens e são

consecutivamente enviados ao núcleo, onde ativam vias transcricionais. A sinalização desta via está envolvida em múltiplos processos e aspectos da vida dos metazoários, incluindo decisões de destino celular, desenvolvimento embrionário e tecidual, função e reparo de tecidos. Além de estar relacionada com várias doenças, como câncer (Zhou *et al.*, 2022).

Os mecanismos pelos quais a γ -secretase realiza sua atividade ainda não são completamente elucidados e seu entendimento têm se mostrado um desafio para o desenvolvimento de fármacos que tenham o complexo como alvo (Hur, 2022). Além disso, não foi encontrado na literatura trabalhos que analisem a interação direta da MOX com a γ -secretase. Contudo, outros membros das LMs foram relacionados a alteração na taxa de peptídeos β -amiloides em neurônios corticais humanos através de mecanismos ainda não esclarecidos (Brownjohn *et al.*, 2017). Nessa perspectiva, estudos demonstraram que os genes os quais transcrevem as proteínas que compõem o complexo γ -secretase possuem representantes ortólogos em peixe-zebra, inclusive aqueles que apresentam mutação na fisiopatologia da DA (PS1, PS2 e APP), ao passo que o modelo vem sendo considerado de extrema utilidade na prospecção de novas drogas para a doença (Newman; Ebrahimie; Lardelli, 2014). Complementarmente, Geling *et al.* (2002) demonstrou que a inibição da γ -secretase em embriões de peixe-zebra bloqueia a sinalização Notch, levando a defeitos somitogênicos e neurogênicos.

Além da γ -secretase, o MCC exibiu outros 4 alvos: PSMB5, PSMB8, GRB2 e HSP90AA1. PSMB5 e PSMB8 são subunidades do proteassoma S20. Proteassomas são complexos proteicos multicatalíticos com atividade dependente de ATP, os quais se encarregam da degradação de proteínas não necessárias e ou não funcionais (Murata; Yashiroda; Tanaka, 2009). Apesar de não haver estudos que indiquem qualquer interação da MOX com essas moléculas na literatura, um trabalho recente de Luo *et al.* (2023) demonstrou que a IVM atua como inibidora da atividade desse complexo proteico no núcleo, através de repressão da importação das subunidades constituintes PSMB5-7 e PSMA3-4.

Por último, GRB2 e HSP90AA1. A Proteína de Choque Térmico 90-Alfa Classe A membro 1 é uma chaperona molecular que faz parte de uma grande

família de proteínas as quais têm suas expressões induzidas por choque térmico ou outros estressores, e possuem como principal função o enovelamento e maturação de proteínas (Tutar; Tutar, 2010). Essa família tem sido extensamente estudada pois desempenham importantes papéis em carcinogênese (Wu *et al.*, 2017). De modo similar às subunidades do proteossoma, não há estudos na literatura que analisem os efeitos da MOX nessa família de proteínas. Entretanto, Yang, Xiao e Cao (2021), em um trabalho com a IVM, sugeriram que o composto inibe a fosforilação de um dos membros dessa família, a HSP27. Para além disso, outra LM, a avermectina, induziu a expressão de proteínas desse grupo em pombos, *in vivo* e *in vitro* (Li *et al.*, 2014). Já a proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (GRB2) é uma proteína adaptadora que é responsável pela intermediação e regulação de vias de sinalização, transdução de sinal e expressão gênica através da via da proteína Ras (Wang *et al.*, 2024). Assim como os outros alvos anteriormente discutidos, a GRB2 também possui homólogos em peixe-zebra (Mauri *et al.*, 2021) assim como não constam estudos, na literatura, os quais investiguem a interação dessa proteína com componentes das LMs.

5.2. Análise das vias Reactome e GO

5.2.1. Análise das vias Reactome

A base de dados Reactome agrega milhares de dados sobre vias e genes relativos à espécie humana. Segundo Gillespie *et al.* (2022), no ano de 2021 a base totalizava 10726 entradas, correspondendo a 52,5% dos 20442 genes codificadores de proteínas humanos. Além disso, os autores, para o mesmo ano, apontam que a base hospedava informações de 2546 vias biológicas, classificadas em 28 supervias (e.g. sistema imune, metabolismo e autofagia) as quais descrevem o funcionamento normal celular.

Nessa perspectiva, o enriquecimento dos alvos da topologia resultou em 349 vias Reactome, das quais foram selecionadas as 30 primeiras, baseado no p-

valor. Dentre elas, destacou-se a sinalização por receptores tirosina cinase (Figura 7). As proteínas desta classe constituem uma família de receptores de superfície de membrana, os quais possuem estruturas e mecanismos de ação altamente conservados evolutivamente desde espécies de nematódeos como o *Caenorhabditis elegans* até seres humanos. Eles compreendem um amplo espectro funcional como reguladores essenciais no controle de proliferação, diferenciação, sobrevivência, metabolismo e migração celulares, além de controle sobre o ciclo celular, os quais são fundamentais para o desenvolvimento de organismos multicelulares como um todo. Disfunções nos receptores desse grupo também estão implicados em diversos processos fisiopatológicos, como câncer, diabetes e inflamação (Lemmon; Schlessinger, 2010; Schlessinger, 2000).

Outras vias relacionadas com desenvolvimento que apareceram foram as de transdução de sinal; doenças de transdução de sinal por receptores de fator de crescimento e segundos mensageiros; biologia do desenvolvimento; ativação e sinalização dos receptores NOTCH2, 3, 4 e transmissão de sinal para o núcleo, entre outras. Como já dito anteriormente, os mecanismos de ação intencionais conhecidos da MOX e das demais LMs em invertebrados se dão através da indução de distúrbios ao sistema nervoso. Nos resultados observados, também estão presentes vias inerentes a esse sistema, a exemplo da orientação do axônio; desenvolvimento do sistema nervoso e sinalização pelo Receptor Neurotrófico Tirosina Cinase 1 (NTRK1), envolvido na proliferação, diferenciação e sobrevivência de células nervosas (Zhang *et al.*, 2023).

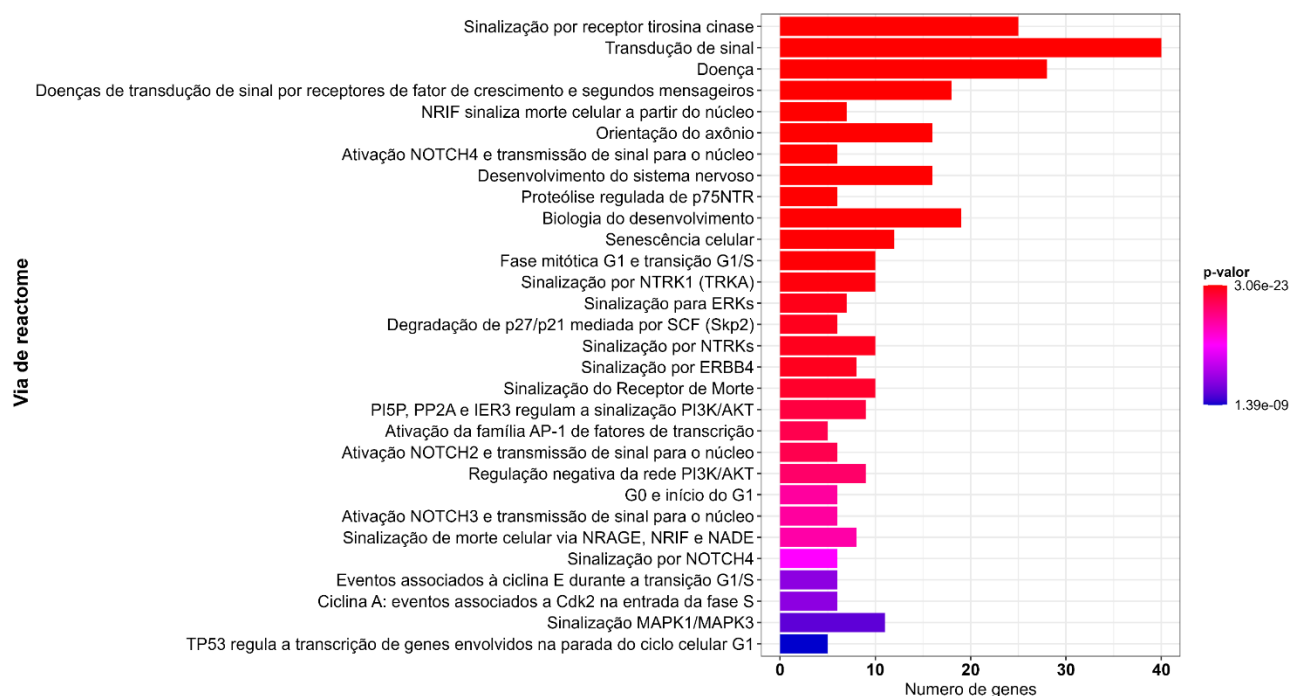


Figura 7. Resultados da análise das vias Reactome para os alvos da MOX relacionados com o efeito de toxicidade do desenvolvimento. O top 30 das vias baseado no p-valor estão expostas. O eixo X aponta a quantidade de genes, enquanto a transição de cores do vermelho para o azul indica a diminuição do p-valor.

5.2.2. Análise das vias GO

A ontologia genética (GO), é um esforço colaborativo que tem como principais premissas o desenvolvimento de vocabulários (ontologias) que possam descrever importantes componentes da biologia molecular, como produtos genéticos e sequencias biológicas; aplicar esses vocabulários na anotação de sequências em bases de dados biológicos e criar um ambiente público e centralizado que permita o acesso universal aos dados biológicos (Gene Ontology Consortium, 2004). Nesse trabalho, a análise das vias GO levou em consideração 3 categorias de dados: processos biológicos (BP), função molecular (MF) e componente celular (CC¹), (p-valor < 0,01).

Ao todo, foram obtidas 140 vias GO, divididas em 84 relativas a BP, 14 a MF e 42 a CC¹. Para cada uma das categorias foram selecionados o top 30 com base no p-valor. Em processo biológico, a via que ocupou a primeira posição foi a de “regulação da função molecular” (Figura 8A). Segundo a própria base de dados essa via seria definida como qualquer processo que possa modular a frequência, taxa ou extensão de funções moleculares, atividades biológicas chave que ocorrem a nível molecular (e.g. catálise ou ligação) (AmiGO 2, 2024). Outras vias também presentes são: transdução de sinal; respostas a estímulos abióticos, químicos e endógenos; desenvolvimento do sistema imune; desenvolvimento de organismos multicelulares; desenvolvimento e morfogênese de estruturas anatômicas; ciclo celular, e processos de movimento e organização celulares.

No que diz respeito à função molecular, a principal via encontrada foi a de “atividade catalítica, agindo sobre uma proteína” (Figura 8B). Essa via agrupa genes os quais participam de processos catalíticos de modo a modificar outras proteínas. Um exemplo é a já discutida aqui γ -secretase, que catalisa a proteólise da PPA em peptídeos β -amiloides. No geral, a maiores das vias retornadas descrevem ligação a diferentes compostos e atividades enzimáticas.

Por fim, a categoria “componente celular” (CC¹), a qual descreve vias bioquímicas que agem/ocorrem em determinadas partes celulares ou teciduais, teve como representante as vias que atuam no “corpo celular” (Figura 8C). Predominantemente, os outros resultados estão atrelados à membrana plasmática e à célula de maneira geral. Também deve-se notar que um dos principais resultados é “parte do neurônio”, reforçando a ideia de neurotoxicidade da MOX.

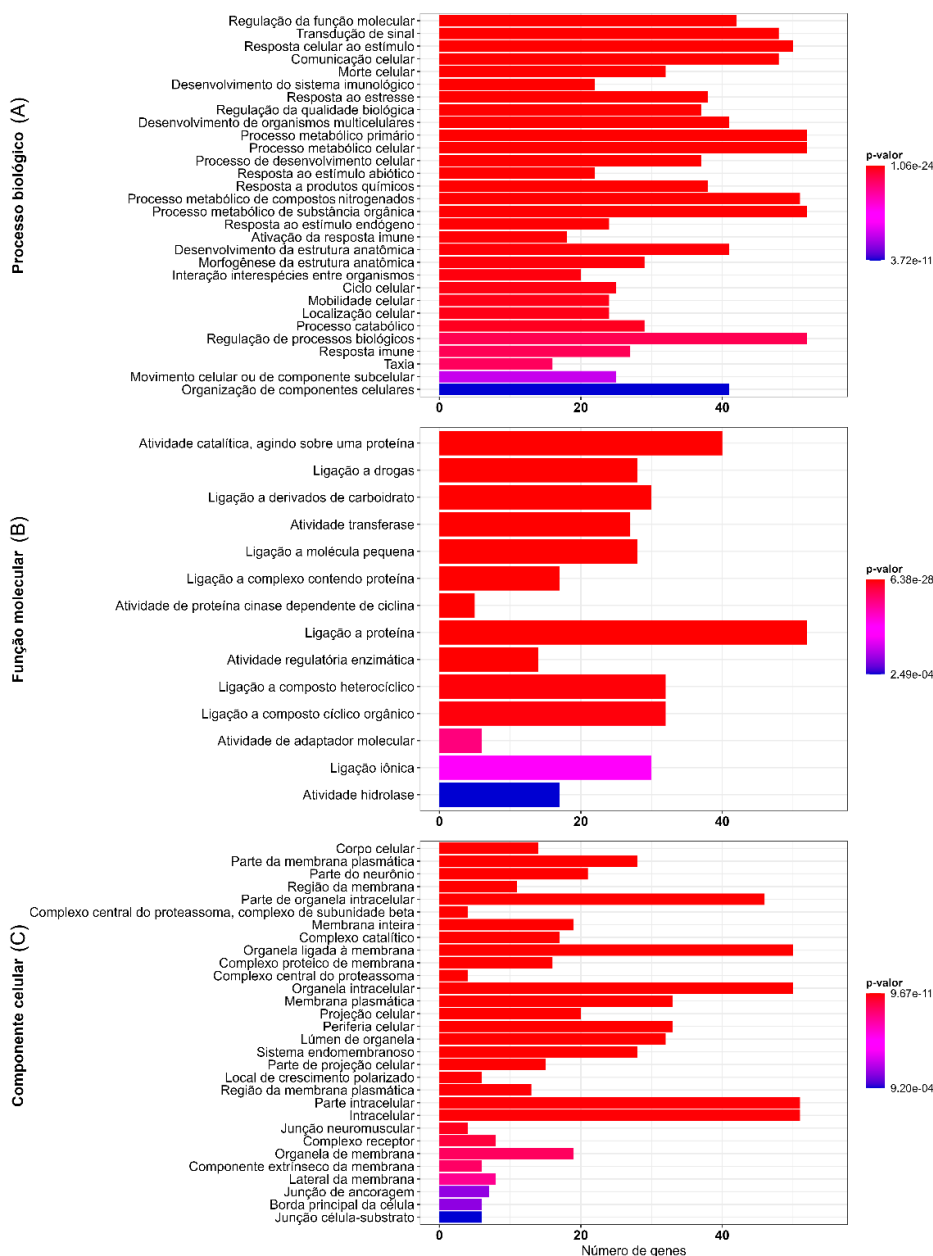


Figura 8 - Resultados da análise das vias GO para os alvos da MOX relacionados com o efeito de toxicidade do desenvolvimento. O top 30 vias das categorias (A) processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular estão expostas baseado no p-valor. O eixo X, aponta a quantidade de genes, enquanto a transição de cores do vermelho para o azul indica a diminuição do p-valor.

5.3. “Docking” molecular

As simulações de “docking” molecular foram realizadas entre a MOX e as subunidades catalíticas PS1 e PS2 da γ -secretase, além de um controle positivo (MRK-560), com o objetivo de prever e comparar as possíveis interações e suas energias. Como já pontuado anteriormente, pelo fato dos alvos mais importantes encontrados fazerem parte do mesmo complexo proteico, e suas atividades biológicas estarem atreladas a esse fato, foram usados apenas os respectivos sítios ativos do complexo γ -secretase (PS1 e PS2) durante o “docking”. Para dar mais confiabilidade aos resultados, foram usados 2 programas de docking diferentes, o MVD e o Autodock Vina (interface PyRx). Em ambos os programas, quanto mais negativa for a energia resultante, mais fortemente ocorre a interação.

No MVD, o moldock score (energia de ligação) entre a γ -secretase (subunidade PS1 como sítio ativo) e a MOX foi de $-151,476 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, e a energia do complexo com a PS2 foi de $-142,869 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. Essas energias superaram as do padrão positivo, as quais foram $-91,092$ e $-54,480 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (PS1 e PS2, respectivamente). Já no Autodock Vina, a afinidade de ligação para o complexo com a PS1 foi de $-9,4 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e com a PS2 foi $-8,3 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, com energias do controle positivo menores, $-9,0$ e $-7,5 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ para as subunidades PS1 e PS2, respectivamente. Vale ressaltar que os programas usam algoritmos e sistemas de ranqueamento distintos, por isso a forma de apresentar os resultados também segue a mesma linha. Esses dados estão detalhadamente expostos nas Tabelas 2 e 3. É possível afirmar que essas são boas energias de interação baseando-se em vários estudos *in silico* os quais delimitam bons valores nesse quesito (Beteringhe *et al.*, 2013; Keretsu; Bhujbal; Cho, 2020; Shen *et al.*, 2013).

Tabela 2. Energias de ligação entre a MOX, o controle positivo e os sítios catalíticos do complexo γ -secretase, PS1 e PS2, em Kcal.mol⁻¹, usando o software Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0.

Proteínas Alvo	MOX		Controle positivo	
	Moldock Score	Rerank Score	Moldock Score	Rerank Score
γ-secretase (PS1)	-151,476	-110,944	-91,092	-53,514
γ-secretase (PS2)	-142,869	-104,912	-54,480	-42,607

Nota: MVD: Molegro Virtual Docker; MOX: Moxidectina; PS1: Presenilina 1; PS2: Presenilina 2.

Tabela 3. Afinidade de ligação entre a MOX, o controle positivo e os sítios catalíticos do complexo γ -secretase, PS1 e PS2, em Kcal.mol⁻¹, usando o software Autodock Vina (interface PyRx).

Proteínas Alvo	MOX	Controle positivo
	Afinidade de ligação	Afinidade de ligação
γ-secretase (PS1)	-9.4	-9.0
γ-secretase (PS2)	-8.3	-7.5

Nota: MOX: Moxidectina; PS1: Presenilina 1; PS2: Presenilina 2.

Para a γ -secretase (subunidade PS1) os ligantes estabeleceram ligações de hidrogênio e carbono-hidrogênio, de halogênio e alquil com resíduos de aminoácido específicos (Figura 9A). Assim como o padrão positivo MRK-560, a MOX formou ligação de hidrogênio com o resíduo GLY³⁸⁴. Ambos os compostos estabeleceram interações similares também com PRO⁴³³, com a MOX e o MRK-560 formando ligação alquil. Além disso, ASP³⁸⁵ e GLY³⁸² estabeleceram ligações de hidrogênio e carbono-hidrogênio com a MOX e o MRK-560, respectivamente. Em contrapartida, a MOX e o controle também se conectaram com LEU²⁸⁶ e ALA⁴³⁴, mas de maneiras diferentes. Quanto a γ -secretase (subunidade PS2), tanto a MOX quanto o padrão positivo interagiram por meio de ligação alquil com o resíduo ALA¹⁰⁴. Em virtude da reduzida quantidade de dados disponíveis na literatura e ineditismo do trabalho, torna-se difícil a comparação com trabalhos já consolidados.

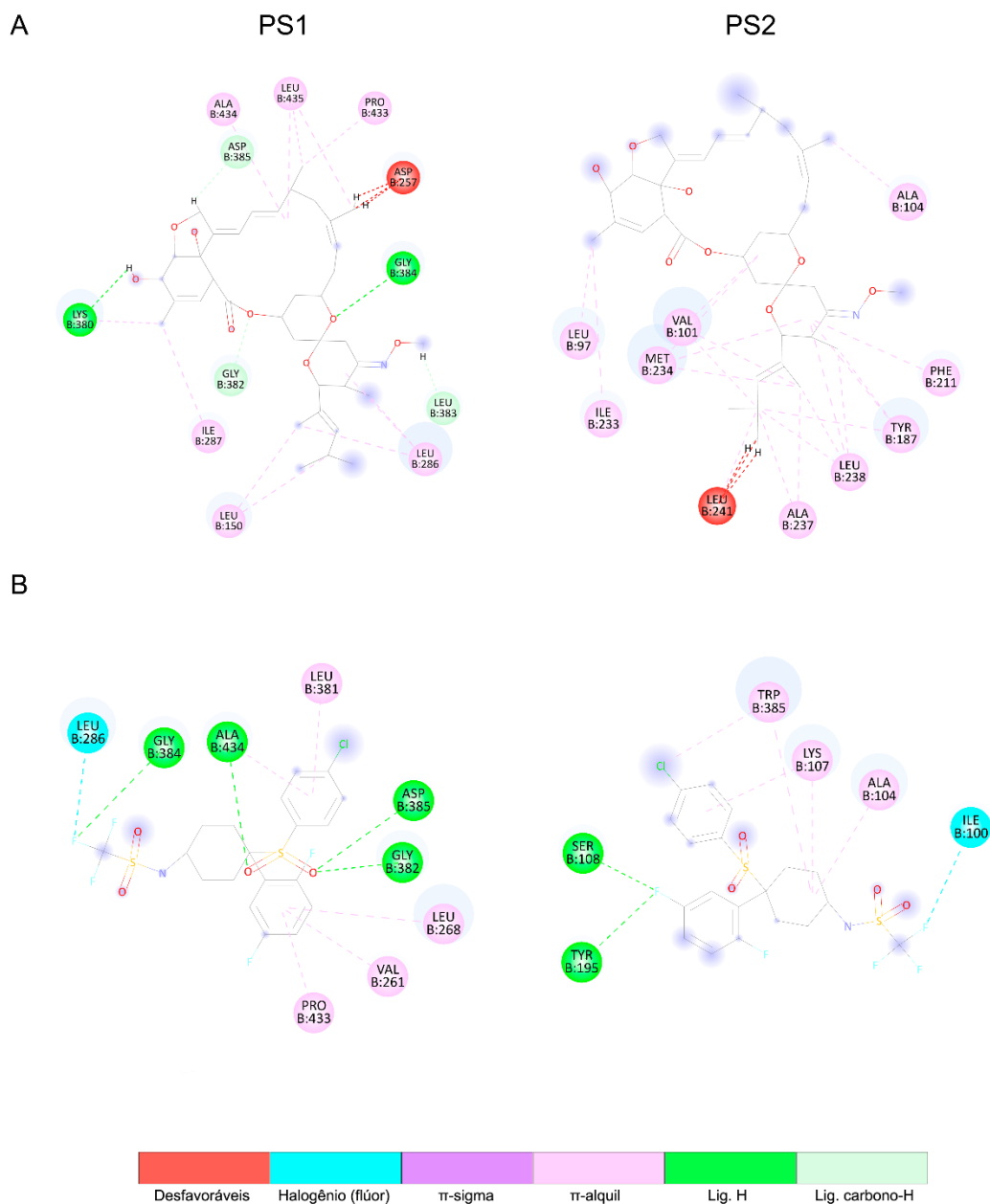


Figura 9. (A) Gráficos 2D retratando as interações entre a MOX e resíduos de aminoácidos das subunidades catalíticas PS1 e PS2 do complexo γ -secretase. (B) Interação entre as proteínas citadas anteriormente e o padrão positivo MRK-560. Imagens produzidas no software Discovery Studio 2021.

5.4. Dinâmica molecular

Após a predição dos potenciais alvos da MOX relacionados a importantes vias de toxicidade do desenvolvimento, foram realizadas simulações de DM para avaliar a flexibilidade dos complexos formados entre os alvos selecionados e os ligantes (MOX e MRK-560) e a estabilidade de suas interações na presença de fatores como solvente, íons, pressão e temperatura. Esta informação é importante porque complementa os resultados de “docking” e permite avaliar se o composto permanece fortemente ligado às subunidades catalíticas na presença de fatores encontrados em meio fisiológico. Após a escolha dos alvos, calculou-se o RMSD para os átomos de C α da enzima complexada e as estruturas de cada ligante, separadamente.

5.4.1. Desvio quadrático médio (RMSD)

Em relação a γ -secretase humana contendo a PS1, a análise da métrica RMSD da enzima (Figura 10A) mostrou que o complexo mais instável foi referente a proteína (linha preta), visto que ela apresentou valores de RMSD mais elevados, correspondendo a 0.75 nm no período de 40 ns, o qual se configura como o valor mais alto e o pico de maior instabilidade. Nesse mesmo alvo, os compostos de maior estabilidade foram a MOX (linha vermelha) e o MRK-560 (linha verde). A MOX apresentou valores de RMSD correspondentes a 0.57 nm em toda a simulação, com um aumento no período de 90 ns, no qual foram observados valores de 0.6 nm. Já o MRK-560 retornou valores de RMSD correspondentes a 0.57 nm com a presença de uma flutuação de 6.5 nm no período de 30 ns. Para a γ -secretase contendo a PS2 (Figura 10B), foi observado que os três complexos em estudo apresentaram uma maior estabilidade, pois foi observada uma baixa ocorrência de flutuações, com o antiparasitário (linha vermelha), apresentando a maior estabilidade, com valores de RMSD correspondentes a 0,73 nm no período de 40 ns e a 0.80 nm no período de 80 ns. O MRK-560 (linha verde) e a protease (linha preta) foram os complexos

mais instáveis, visto que foram observadas flutuações de até 0.83 nm. A estabilidade das proteínas PS1 e PS2 é essencial para manter os compostos ligados ao sítio ativo.

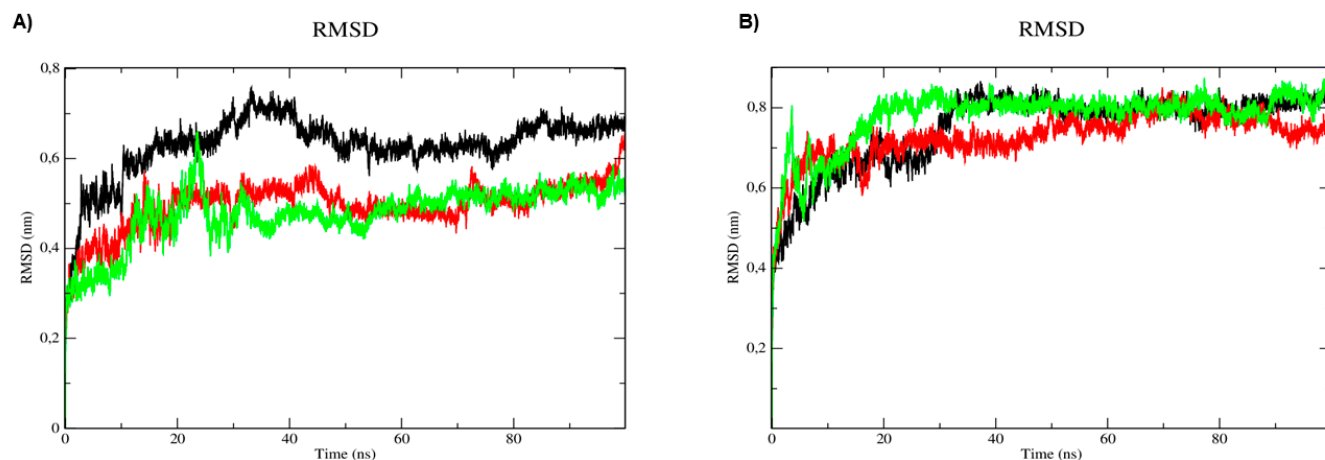


Figura 10. RMSD dos átomos de C α . (A) γ -secretase humana (PS1) (linha preta) complexada aos compostos MOX (linha vermelha) e MRK-560 (linha verde). (B) enzima γ -secretase (PS2) (linha preta) complexada ao antiparasitário MOX (linha vermelha) e padrão positivo MRK-560 (linha verde).

Ao analisar a estabilidade dos ligantes separados do alvo, mediante a presença de solventes e outros parâmetros, foi verificado que para a γ -secretase subunidade PS1 (Figura 11A) o composto teste MOX (linha vermelha) apresentou valores de RMSD mais baixos que os resultados obtidos para o padrão positivo (linha verde), visto que este foi drasticamente mais instável. Em relação ao alvo contendo a PS2 (Figura 11B), o MRK-560 (linha verde) apresentou valores de RMSD mais baixos quando comparado a MOX (linha vermelha). Portanto, para a subunidade PS1 na presença de solventes, íons e outros fatores, a MOX demonstrou ser capaz de estabelecer ligações fortes com o sítio ativo. Dessa forma, sugere-se que a mesma tende a permanecer no sítio ativo mesmo na presença de diferentes fatores como temperatura, pressão, solvente e íons.

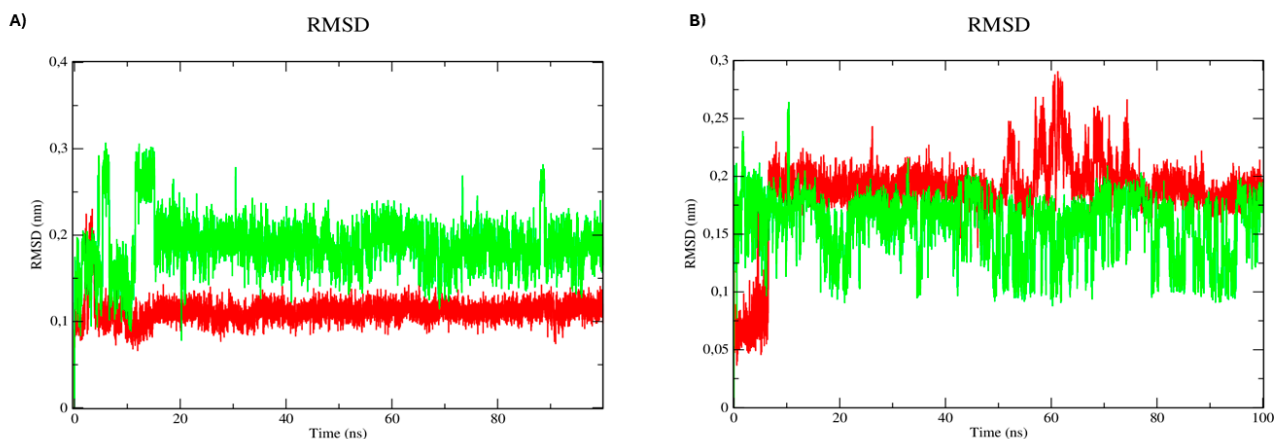


Figura 11. RMSD dos átomos de Ca dos compostos. (A) γ -secretase humana (PS1): MOX (linha vermelha) e MRK-560 (linha verde). (B) γ -secretase (PS2): MOX (linha vermelha) e padrão positivo (linha verde).

5.4.2. Flutuação quadrática média (RMSF) e Raio de rotação (RG)

Para compreender a flexibilidade dos resíduos de aminoácido que contribuem para a mudança conformacional dos complexos em estudo, foram calculadas as flutuações quadráticas médias de cada aminoácido na proteína (Figura 12). Resíduos com valores elevados de RMSF sugerem mais flexibilidade e valores baixos de RMSF refletem menos flexibilidade. Considerando que aminoácidos com flutuações acima de 0,3 nm contribuem para a flexibilidade da estrutura da protease, verificou-se que dentre os aminoácidos presentes na γ -secretase (PS1) (linha preta), complexada com a MOX (linha vermelha) e com o controle positivo (linha verde) (Figura 12A), os resíduos nas posições: 73, 189-191 e 278-280 contribuem para a mudança conformacional da proteína, como também é importante mencionar que GLU^{280} e ARG^{278} são importantes resíduos no estabelecimento de ligação da enzima alvo, sendo extremamente importantes para a sua atividade catalítica, mas não fazem parte do sítio ativo (Zhou *et al.*, 2019). Em

relação à γ -secretase contendo PS2 (linha preta) complexada ao antiparasitário estudado (linha vermelha) e ao MRK-560 (linha verde) (Figura 12B), observou-se que os aminoácidos nas posições 85-86, 194-202, 209 e 250 conferem maior flexibilidade ao complexo. Valendo salientar que nenhum dos resíduos mencionados é componente do sítio ativo da referida enzima (Guo *et al.*, 2012). Como já citado anteriormente, há uma forte limitação de dados aos quais esses resultados possam ser comparados, o que, mais uma vez, reforça o ineditismo do trabalho.

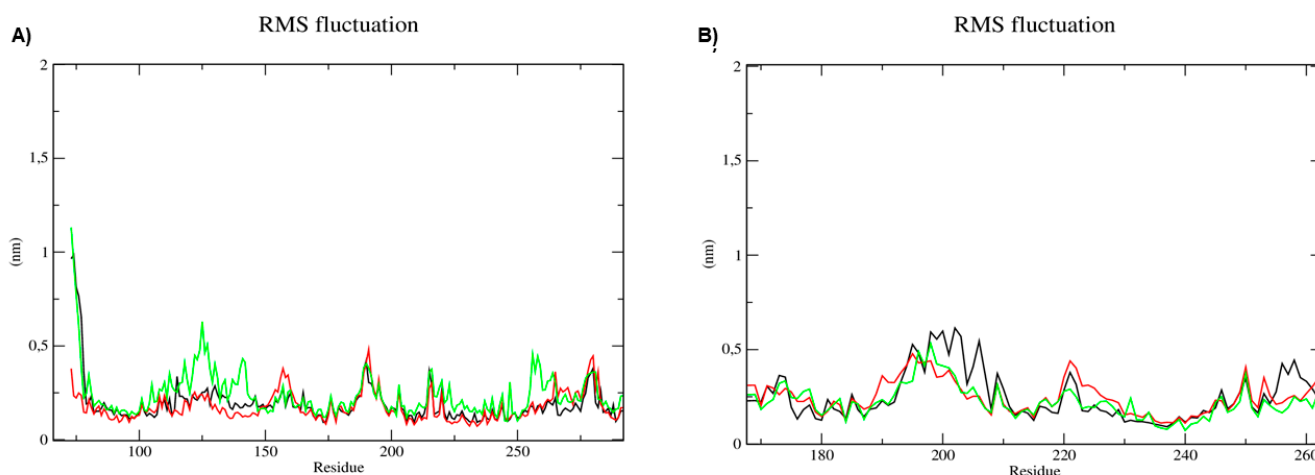


Figura 12. RMSF dos átomos de C α dos complexos. (A) γ -secretase humana com a subunidade PS1 como sítio catalítico (linha preta) complexada aos compostos MOX (linha vermelha) e controle positivo MRK-560 (linha verde). (B) complexo γ -secretase contendo PS2 (linha preta) em complexo com o antiparasitário MOX (linha vermelha) e padrão positivo MRK-560 (linha verde).

Adicionalmente, também foi analisada a evolução dos níveis de empacotamento proteico de forma isolada e em complexo com a MOX e o ligante padrão de cada proteína, utilizando os valores do raio de rotação (Rg). Em resumo, Rg fornece uma ideia de quão compacta ou estendida é uma molécula durante uma simulação de DM, fornecendo informações sobre a conformação, estabilidade,

interações e flexibilidade das moléculas em análise. Observou-se que as moléculas, quando acopladas às proteínas, não apresentam variações em relação à proteína isoladamente, principalmente quando se refere à enzima γ -secretase (PS1) (Figura 13A), isto indica que estes complexos podem apresentar flutuações na estrutura terciária das enzimas.

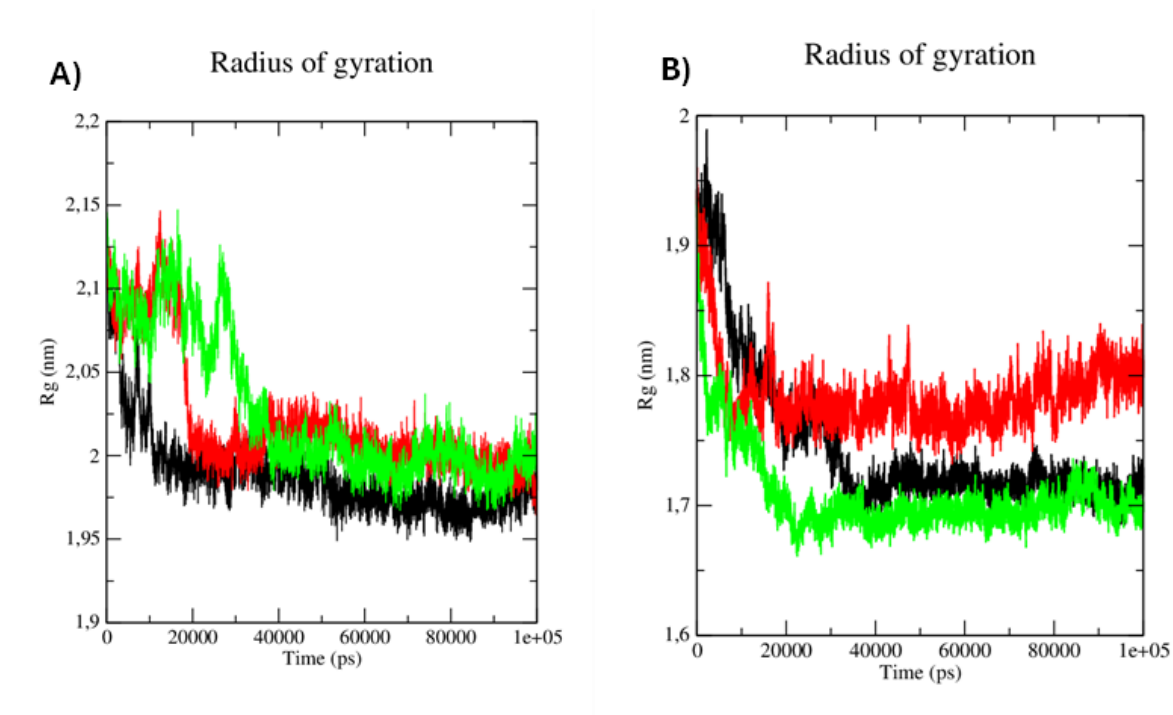


Figura 13. Raio de rotação (Rg). (A) γ -secretase humana (PS1) (linha preta) complexada com os compostos MOX (linha vermelha) e MRK-560 (linha verde). (B) enzima γ -secretase contendo PS2 (linha preta) e complexada aos compostos MOX (linha vermelha) e MRK-560 (linha verde).

5.4.3. Energias de interação Coulomb e Lennard-Jones

As energias de interação Coulomb e Lennard-Jones (Tabela 04) dos complexos proteína-ligante foram calculadas para fornecer *insights* sobre a estabilidade das interações dentro do sítio ativo. Com base nos cálculos de energia de Lennard-Jones, o composto teste MOX demonstrou uma maior estabilidade de

interação com o sítio ativo da enzima, demonstrando uma grande contribuição das interações de Van der Waals. Em contrapartida, de acordo com as métricas de Coulomb, o controle positivo apresentou maior estabilidade, demonstrando maior contribuição de energia eletrostática nas interações estabelecidas.

Tabela 4. Valores de energia de interação Coulomb e Lennard-Jonnes.

Energia	γ-secretase (PDB: 6IYC)		γ-secretase (PDB: 7Y5X)	
	Moxidectina	MRK-560	Moxidectina	MRK-560
Coulomb (C) - Eletrostática	-17.1054	-38.5801	-14.0847	-87.7575
Lennard-Jonnes (LJ) - Van der Waals	-248.588	-118.601	-180.447	-159.846

Legenda: Em negrito, destaca-se a menor energia.

O presente trabalho é o primeiro a realizar simulações de DM entre a MOX e os sítios catalíticos do complexo γ -secretase, como também é pioneiro no estabelecimento da conexão entre a toxicidade do desenvolvimento exercida pela MOX e os alvos citados acima. Sen, Kandasamy e Ghosh (2023), já haviam realizado simulações de DM com a γ -secretase e várias drogas distintas, obtendo um valor de RMSD 0,2827 para a protease sozinha. Entretanto, deve-se levar em consideração que os autores citados utilizaram parâmetros diferentes dos usados aqui. De modo geral, valores de RMSD e RMSF da γ -secretase e suas subunidades, na literatura, giram em torno de 0,2 - 0,6 nm, valores que não estão distantes dos obtidos nesse estudo (Sen; Kandasamy; Ghosh, 2023). Quanto ao raio de rotação para o complexo alvo, alguns autores obtiveram valores que vão de 2,24 a 4,35 nm (Dehury *et al.*, 2019; Dehury; Tang; Kepp, 2019; Martiz *et al.*, 2022).

Analisando os resultados obtidos de forma integrada, é possível propor (de forma preliminar) um modo de ação de toxicidade do desenvolvimento da MOX em embriões de peixe-zebra (Figura 14), que explicaria os efeitos adversos (atraso de eclosão do ovo, estresse oxidativo e acúmulo de MOX na cabeça e nos olhos) descritos por Muniz *et al.* (2021). Como primeiro evento relevante, acontece a interação inicial do antiparasitário com o complexo da γ -secretase.

Secundariamente, o antiparasitário tem o potencial de gerar estresse oxidativo, como já observado por Muniz *et al.*, (2021). Respostas a agentes estressores, comprovadamente, podem levar à clivagem e consequente desativação da HSP90, fazendo as proteínas “clientes”, antes reguladas por sua atividade, se desestabilizarem ou serem desativadas, tornando-as suscetíveis a degradação pelo proteassoma (Beck *et al.*, 2011). Nesse viés, o estresse oxidativo também é tido como um dos mecanismos moleculares a estimular a atividade dos receptores tirosina cinase, assim como alterações na via do NOTCH (Leite *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015). Essas interações, que foram confirmadas por análises de interação molecular, provocam disfunção da sinalização celular e regulação de proteínas, especialmente por afetarem a via NOTCH. Como consequência, uma série de eventos bioquímicos e celulares são afetados, que ocasionam distúrbios na comunicação celular e no desenvolvimento do sistema nervoso. Dessa forma, embriões de peixe-zebra expostos a concentrações subletais de MOX podem ter o seu desenvolvimento normal comprometido, o que foi verificado pelo atraso de eclosão. Além disso, é possível que a bioacumulação do composto na cabeça e olhos dos embriões deva-se a alta lipofilicidade do antiparasitário aliada a afinidade por alvos do sistema nervoso.

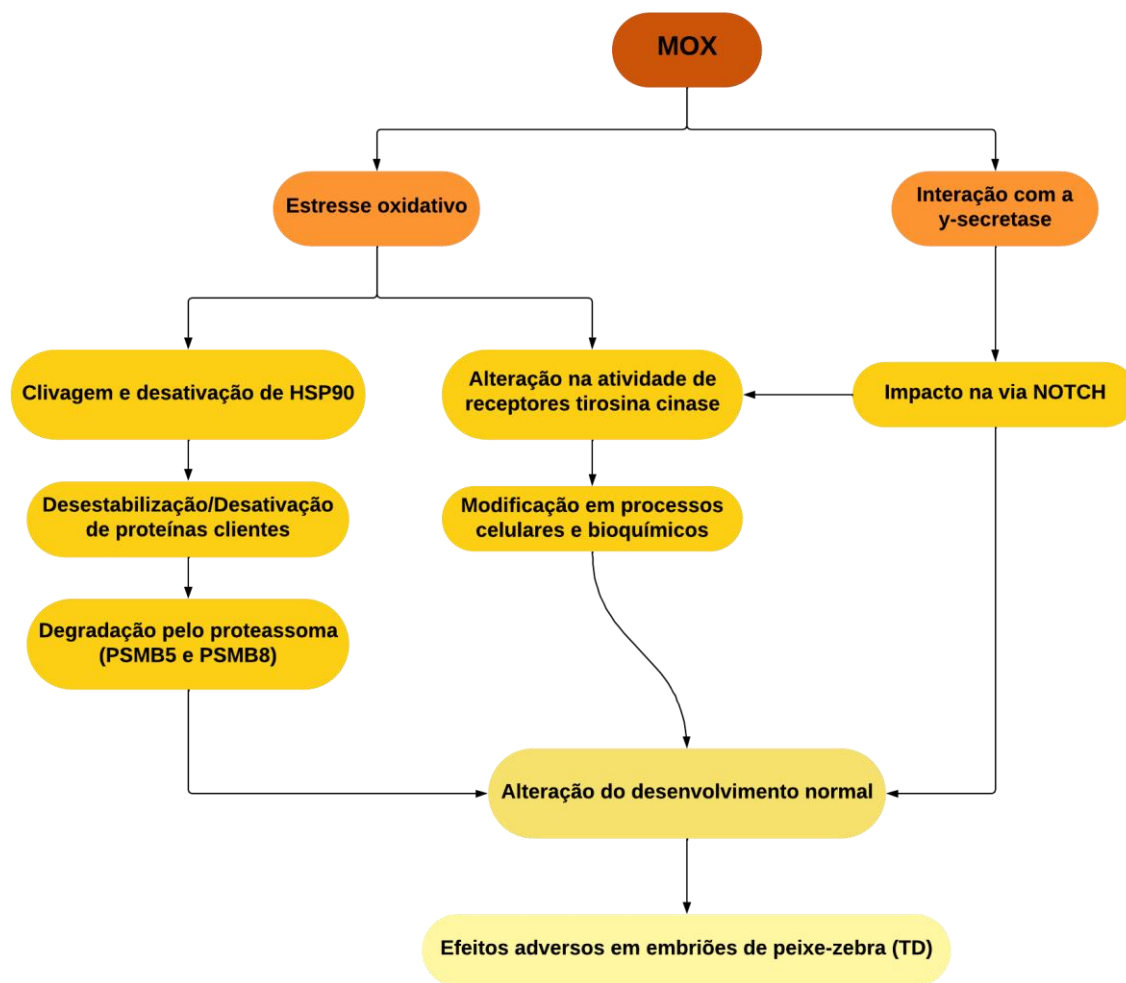


Figura 14. Proposta de modo de ação de toxicidade do desenvolvimento da moxidectina em embriões de peixe-zebra.

Nota: Mox: moxidectina; TD: toxicidade do desenvolvimento.

6. CONCLUSÃO

Através de abordagens *in silico* de toxicologia de rede e análises de interação molecular, evidenciou-se alvos promissores envolvidos com efeitos de toxicidade do desenvolvimento em embriões de peixe-zebra expostos ao antiparasitário de uso veterinário moxidectina. Em especial, o complexo proteico γ -secretase, que participa de vias determinantes no desenvolvimento de organismos multicelulares por meio da sinalização Notch, e que também é um alvo chave em processos fisiopatológicos do sistema nervoso. Adicionalmente, vias de desenvolvimento costumam ser altamente conservadas evolutivamente, e qualquer alteração nelas pode levar a efeitos adversos a nível de indivíduo e/ou populacional e de comunidade, com potencial para desestruturar a cadeia trófica.

As pesquisas e dados referentes ao antiparasitário estudado ainda são extremamente escassos na literatura e infelizmente sua regulamentação no Brasil está muito aquém da realidade de outros países. Por mais que alguns trabalhos tenham tentado elucidar seu mecanismo de ação, muito pouco se sabe, sobretudo cronicamente, sobre seus possíveis efeitos adversos e mecanismos de toxicidade. Principalmente no momento atual, no qual o composto se tornou o segundo de sua família a ser aprovado para o tratamento de uma parasitose em humanos, urge a necessidade de mais estudos.

Os resultados aqui registrados trazem luz à possíveis mecanismos tóxicos inéditos pelos quais a moxidectina poderia desempenhar suas alterações fisiológicas/metabólicas das quais pouco se têm conhecimento, assim como também representam um passo inicial dentre muitos que precisarão ser dados para que os níveis ambientais da moxidectina sejam devidamente regulamentados e monitorados, e para que mais alvos e efeitos tóxicos possam ser documentados.

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA FIOCRUZ. **Doenças negligenciadas**. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>> Acesso em: 2 Abr. 2024.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal**. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5> Acesso em: 17 Jan. 2024.

AmiGO 2. **Regulation of molecular function**. Disponível em <<https://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0065009>> Acesso em: 20 de Abr. 2024.

BECK, Raphaël et al. Molecular chaperone Hsp90 as a target for oxidant-based anticancer therapies. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 18, p. 2816-2825, 2011.

BELDEN, Jason. Introduction to ecotoxicology. In: **An introduction to interdisciplinary toxicology**. Academic Press, 2020. p. 381-393.

BETERINGHE, Adrian et al. Molecular docking studies involving transitional metal complexes (Zn (II), Co (II), Cu (II), Fe (II), Ni (II) with cholic acid (AC) as ligand against aurora a kinase. **Advanced Materials Research**, v. 787, p. 236-240, 2013.

BHATTARAI, Apurba et al. Mechanisms of γ -secretase activation and substrate processing. **ACS central science**, v. 6, n. 6, p. 969-983, 2020.

BOXALL, Alistair et al. **Uses and inputs of veterinary medicines in the environment**. CRC Press, 2007.

BRASIL. Decreto-lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969. **Lex**. coletânea da legislação: edição federal, São Paulo, v. 1, 1969.

BROWNJOHN, Philip W. et al. Phenotypic screening identifies modulators of amyloid precursor protein processing in human stem cell models of Alzheimer's disease. **Stem cell reports**, v. 8, n. 4, p. 870-882, 2017.

BURG, Richard W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 361-367, 1979.

CAMPBELL, Karen L. Sulphonamides: updates on use in veterinary medicine. **Veterinary dermatology**, v. 10, n. 3, p. 205-215, 1999.

- CAMPBELL, Sotonye; SOMAN-FAULKNER, Kristina. Antiparasitic drugs. 2019.
- CAPANEMA, Luciana Xavier de Lemos et al. Panorama da indústria farmacêutica veterinária. 2007.
- CARSON, Rachel et al. **Silent spring**. Penguin Books, 1962.
- CHAPMAN, Peter M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7-15, 2002.
- CHICCO, Davide; AGAPITO, Giuseppe. Nine quick tips for pathway enrichment analysis. **PLoS computational biology**, v. 18, n. 8, p. e1010348, 2022.
- DE MENEZES OLIVEIRA, Vanessa et al. Os medicamentos veterinários no meio ambiente: aplicações e implicações. **Revista Captar: Ciência e Ambiente Para Todos**, v. 1, n. 2, p. 183-192, 2009.
- DEHURY, Budheswar et al. Structure and dynamics of γ -secretase with presenilin 2 compared to presenilin 1. **RSC advances**, v. 9, n. 36, p. 20901-20916, 2019.
- DEHURY, Budheswar; TANG, Ning; KEPP, Kasper P. Molecular dynamics of C99-bound γ -secretase reveal two binding modes with distinct compactness, stability, and active-site retention: implications for A β production. **Biochemical Journal**, v. 476, n. 7, p. 1173-1189, 2019.
- DOESCHL-WILSON, Andrea et al. Livestock disease resilience: from individual to herd level. **Animal**, v. 15, p. 100286, 2021.
- FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, p. 83-89, 2019.
- FARIAS, Davi Felipe et al. COVID-19 Therapies in Brazil: Should we be concerned with the impacts on aquatic wildlife?. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 39, n. 12, p. 2348, 2020.
- FLINT, Mary Louise; VAN DEN BOSCH, Robert. **Introduction to integrated pest management**. Springer Science & Business Media, 2012.
- FORT DODGE ANIMAL HEALTH. **Environmental Assessment – CYDECTIN moxidectin 0.5% Pour-On for Cattle**, [s. l.], 1997. Disponível em: <<https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadEA/146>> Acesso em: 20 Jan. 2024.
- FULLER, Richard et al. Pollution and health: a progress update. **The Lancet Planetary Health**, v. 6, n. 6, p. e535-e547, 2022.

GEISSEN, Violette et al. Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. **International soil and water conservation research**, v. 3, n. 1, p. 57-65, 2015.

GELING, Andrea et al. A γ -secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. **EMBO reports**, 2002.

GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl_1, p. D258-D261, 2004.

GILL, Supreet Kaur et al. Emerging role of bioinformatics tools and software in evolution of clinical research. **Perspectives in clinical research**, v. 7, n. 3, p. 115-122, 2016.

GILLESPIE, Marc et al. The reactome pathway knowledgebase 2022. **Nucleic acids research**, v. 50, n. D1, p. D687-D692, 2022.

Gomes, Cleyton de Sousa et al. Predição *in chemico* e *in silico* de efeitos tóxicos do antiparasitário de uso veterinário moxidectina em peixes: toxicidade aguda e neurotoxicidade. In: One, Giselle Medeiros da Costa (Org.) **Saúde e Meio Ambiente: Pesquisa, Tecnologia e Aplicabilidade**. João Pessoa: IMEA, 2023. p. 198 - 218.

GUO, Jiahua et al. Toxicological and ecotoxicological risk-based prioritization of pharmaceuticals in the natural environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 1550-1559, 2016.

HEALTH FOR ANIMALS. **Global trends in the animal health sector: 2022 outlook**. Disponível em: <<https://healthforanimals.org/>> Acesso em: 15 Jan. 2024.

HEALTH PRODUCTS REGULATORY AUTHORITY. Summary of Product Characteristics: Tauramox 5 mg/ml Pour-On Solution for Cattle, Dublin, 2019. Disponível em: <<https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadEA/146>>. Acesso em: 17 Jan. 2024.

HOFFMAN, David J. et al. (Ed.). Handbook of ecotoxicology. **CRC press**, 2002.

HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O. Molecular dynamics simulation for all. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129-1143, 2018.

HOPKINS, Andrew L. Network pharmacology. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1110-1111, 2007.

HUR, Ji-Yeun. γ -Secretase in Alzheimer's disease. **Experimental & molecular medicine**, v. 54, n. 4, p. 433-446, 2022.

IBGE. **Senso 2022**. Disponível em: <<https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/>> Acesso em 5 de Fev. 2024.

KERETSU, Seketoulie; BHUJBAL, Swapnil P.; CHO, Seung Joo. Rational approach toward COVID-19 main protease inhibitors via molecular docking, molecular dynamics simulation and free energy calculation. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 17716, 2020.

KHAN, Shamshad et al. Emerging contaminants of high concern for the environment: Current trends and future research. **Environmental Research**, v. 207, p. 112609, 2022.

KLEANDROVA, Valeria V. et al. Computational ecotoxicology: Simultaneous prediction of ecotoxic effects of nanoparticles under different experimental conditions. **Environment international**, v. 73, p. 288-294, 2014.

KOOLS, S. A. E. et al. A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks. **Integrated Environmental Assessment and Management**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 399–408, 2008.

LANGE, Frank T.; SCHEURER, Marco; BRAUCH, Heinz-J. Artificial sweeteners - a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 9, p. 2503-2518, 2012.

LEITE, C. A. V. G. et al. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, p. 130-142, 2012.

LEMMON, Mark A.; SCHLESSINGER, Joseph. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117-1134, 2010.

LI, Ming et al. The change in heat shock protein expression in avermectin induced neurotoxicity of the pigeon (*Columba livia*) both in vivo and in vitro. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 95-102, 2014.

LUO, Hongmei et al. Combinations of ivermectin with proteasome inhibitors induce synergistic lethality in multiple myeloma. **Cancer Letters**, v. 565, p. 216218, 2023.

MARTIZ, Reshma Mary et al. Discovery of novel benzophenone integrated derivatives as anti-Alzheimer's agents targeting presenilin-1 and presenilin-2 inhibition: A computational approach. **PLoS One**, v. 17, n. 4, p. e0265022, 2022.

MAURI, Cristina et al. The adaptor protein Grb2b is an essential modulator for lympho-venous sprout formation in the zebrafish trunk. **Angiogenesis**, v. 24, n. 2, p. 345-362, 2021.

MEGHANATHAN, Natarajan. Maximal clique size versus centrality: a correlation analysis for complex real-world network graphs. In: **Proceedings of 3rd International Conference on Advanced Computing, Networking and Informatics: ICACNI 2015, Volume 2**. Springer India, 2016. p. 95-101.

MENEZ, Cecile et al. Relative neurotoxicity of ivermectin and moxidectin in Mdr1ab (-/-) mice and effects on mammalian GABA (A) channel activity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 11, p. e1883, 2012.

MILTON, Philip et al. Moxidectin: an oral treatment for human onchocerciasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 18, n. 11, p. 1067-1081, 2020.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Agropecuária brasileira em números**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>> Acesso em: 5 de Fev. 2024.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Legislação**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>> Acesso em: 6 de Fev. 2024.

MOLENTO, Marcelo Beltrão. Effect of multidrug resistance modulators on activity against *Haemonchus contortus* and pharmacokinetics of ivermectin and moxidectin in sheep. 2000.

MORIARTY, Frank. Ecotoxicology. **Human toxicology**, v. 7, n. 5, p. 437-441, 1988.

MORRIS, Garrett M.; LIM-WILBY, Marguerita. Molecular docking. **Molecular modeling of proteins**, p. 365-382, 2008.

MUNIZ, Marta Silva et al. A review on the ecotoxicity of macrocyclic lactones and benzimidazoles on aquatic organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 19, p. 54257-54279, 2023.

MUNIZ, Marta Silva et al. Moxidectin toxicity to zebrafish embryos: Bioaccumulation and biomarker responses. **Environmental Pollution**, v. 283, p. 117096, 2021.

MURATA, Shigeo; YASHIRODA, Hideki; TANAKA, Keiji. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 10, n. 2, p. 104-115, 2009.

NAWAZ, Tabish; SENGUPTA, Sukalyan. Contaminants of emerging concern: occurrence, fate, and remediation. In: **Advances in water purification techniques**. Elsevier, 2019. p. 67-114.

NEWMAN, Morgan; EBRAHIMIE, Esmaeil; LARDELLI, Michael. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 89269, 2014.

NOGUERA-OVIEDO, Katia; AGA, Diana S. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. **Journal of hazardous materials**, v. 316, p. 242-251, 2016.

POMPÊO, Marcelo; MOSCHINI-CARLOS, Viviane; LÓPEZ-DOVAL, Julio César. Aspectos da ecotoxicidade em ambientes aquáticos. 2022.

POPP, Maria et al. Ivermectin for preventing and treating COVID-19. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2021.

PRICHARD, Roger; MÉNEZ, Cécile; LESPINE, Anne. Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 134-153, 2012.

QING, Xiaoyu et al. Multiple Target Drug Design Using LigBuilder 3. **Protein-Ligand Interactions and Drug Design**, p. 279-298, 2021.

RAMÍREZ-MALULE, Howard; QUINONES-MURILLO, Diego H.; MANOTAS-DUQUE, Diego. Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. **Emerging contaminants**, v. 6, p. 179-193, 2020.

RICHARDSON, Susan D. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 747-778, 2012.

RICHARDSON, Susan D.; KIMURA, Susana Y. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 1, p. 546-582, 2016.

SAUVÉ, Sébastien; DESROSIERS, Mélanie. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, p. 1-7, 2014.

SCHLESSINGER, Joseph. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 211-225, 2000.

SCHWABE, W. Calvin. **Cattle, priests, and progress in medicine**. Minnesota: University of Minnesota Press, 1978. Vol. 4.

SELZER, Paul M.; EPE, Christian. Antiparasitics in animal health: quo vadis?. **Trends in parasitology**, v. 37, n. 1, p. 77-89, 2021.

SEN, Plaboni; KANDASAMY, Thirukumaran; GHOSH, Siddhartha Sankar. Multi-targeting TACE/ADAM17 and gamma-secretase of notch signalling pathway in TNBC via drug repurposing approach using Lomitapide. **Cellular Signalling**, v. 102, p. 110529, 2023.

SHEN, Mingyun et al. Discovery and optimization of triazine derivatives as ROCK1 inhibitors: molecular docking, molecular dynamics simulations and free energy calculations. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 3, p. 361-374, 2013.

SINDAN SAÚDE ANIMAL. **Indústria veterinária 2022: fechamento COINF**. Disponível em: <https://sindan.org.br/wp-content/uploads/2023/10/Fechamento-Mercado-2022_div-1.pdf> Acesso em: 16 Jan. 2024.

SOMVANSHI, Ramesh. Veterinary medicine and animal keeping in ancient India. **Asian Agri-History**, v. 10, n. 2, p. 133-146, 2006.

SOUZA, Eduardo Costa. **Trajétória da indústria farmacêutica veterinária entre os anos 2000 e 2020: uma análise geral do Brasil e do mundo**. 2021. Tese de Doutorado. [sn].

SOUZA, Juliana Alves da Costa Ribeiro et al. Network Toxicology and Molecular Docking to Investigate the Non-AChE Mechanisms of Organophosphate-Induced Neurodevelopmental Toxicity. **Toxics**, v. 11, n. 8, p. 710, 2023.

STANZIONE, Francesca; GIANGRECO, Ilenia; COLE, Jason C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273-343, 2021.

SUN, Duxin et al. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it?. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 7, p. 3049-3062, 2022.

TAHERAN, Mehrdad et al. Emerging contaminants: here today, there tomorrow!. **Environmental nanotechnology, monitoring & management**, v. 10, p. 122-126, 2018.

TRUHAUT, René. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 1977.

TUTAR, Lutfi; TUTAR, Yusuf. Heat shock proteins; an overview. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 216-222, 2010.

TYAGI, Ashish; SHARMA, Arun K.; DAMODARAN, Chendil. A review on Notch signaling and colorectal cancer. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1549, 2020.

UNIDO, United Nations Industrial Development Organization - 2023. Dados de desenvolvimento industrial mundiais. Disponível em: <[UNIDO Statistics Data Portal](#)> Acesso em: 17 Jan. 2024.

VERCRUYSSSE, Jozef; REW, Robert S. (Ed.). **Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy**. CAB International, 2002.

VIGHI, Marco; VILLA, Sara. Ecotoxicology: The challenges for the 21st century. **Toxics**, v. 1, n. 1, p. 18-35, 2013.

WALKER, Samantha Dawn; MCELDOWNEY, Sharron. Molecular docking: A potential tool to aid ecotoxicity testing in environmental risk assessment of pharmaceuticals. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2568-2577, 2013.

WANG, Dingyi et al. The Configuration of GRB2 in Protein Interaction and Signal Transduction. **Biomolecules**, v. 14, n. 3, p. 259, 2024.

WU, Jianming et al. Heat shock proteins and cancer. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 3, p. 226-256, 2017.

XU, Yiru et al. Notch and TGF- β pathways cooperatively regulate receptor protein tyrosine phosphatase- κ (PTPRK) gene expression in human primary keratinocytes. **Molecular biology of the cell**, v. 26, n. 6, p. 1199-1206, 2015.

YANG, Guanghui et al. Structural basis of γ -secretase inhibition and modulation by small molecule drugs. **Cell**, v. 184, n. 2, p. 521-533. e14, 2021.

YANG, Shuxian; XIAO, Haiyan; CAO, Li. Recent advances in heat shock proteins in cancer diagnosis, prognosis, metabolism and treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112074, 2021.

YILDIRIM, Muhammed A. et al. Drug-target network. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1119-1126, 2007.

ZHANG, Caixia et al. NTRK1-mediated protection against manganese-induced neurotoxicity and cell apoptosis via IGF2 in SH-SY5Y cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 169, p. 115889, 2023.

ZHANG, Qianqian et al. Human health risk assessment of DDTs and HCHs through dietary exposure in Nanjing, China. **Chemosphere**, v. 177, p. 211-216, 2017.

ZHANG, WenJun. Network toxicology: A new science. **Computational Ecology and Software**, v. 6, n. 2, p. 31, 2016.

ZHOU, Bingham et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 95, 2022.