

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

EFEITOS NEUROTÓXICOS DO CONTAMINANTE AMBIENTAL 2,4-DCP: UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA COM TOXICOLOGIA DE REDE, *DOCKING* MOLECULAR E ANÁLISE *IN VIVO* DE BIOMARCADORES

THAIS FEITOSA GUIMARÃES

JOÃO PESSOA/PB
2025

THAIS FEITOSA GUIMARÃES

EFEITOS NEUROTÓXICOS DO CONTAMINANTE AMBIENTAL 2,4-DCP: UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA COM TOXICOLOGIA DE REDE, *DOCKING* MOLECULAR E ANÁLISE *IN VIVO* DE BIOMARCADORES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas como requisito parcial para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba/UFPB. Período: 2025.1

Orientador: Davi Felipe Farias

Coorientador: Me. Rafael Xavier Martins

JOÃO PESSOA/PB

2025

THAIS FEITOSA GUIMARÃES

EFEITOS NEUROTÓXICOS DO CONTAMINANTE AMBIENTAL 2,4-DCP: UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA COM TOXICOLOGIA DE REDE, *DOCKING* MOLECULAR E ANÁLISE *IN VIVO* DE BIOMARCADORES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas como requisito parcial para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba/UFPB.
Período: 2025.1

Data: 03/10/2025
Resultado: 9,5

Documento assinado digitalmente
gov.br
DAVI FELIPE FARIAS
Data: 13/10/2025 18:04:43-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

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

Documento assinado digitalmente
gov.br
LEONARDO ROGERIO VIEIRA
Data: 13/10/2025 08:40:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____
Examinador I: Dr. Leonardo Vieira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Documento assinado digitalmente
gov.br
JULIANA ALVES DA COSTA RIBEIRO SOUZA
Data: 11/10/2025 08:15:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____
Examinador II: Ma. Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G963e Guimaraes, Thais Feitosa.
Efeitos neurotóxicos do contaminante ambiental 2,4-DCP : uma abordagem integrativa com toxicologia de rede, Docking molecular e análise in vivo de biomarcadores / Thais Feitosa Guimaraes. - João Pessoa, 2025.
59 p. : il.

Orientação: Davi Felipe Farias.
Coorientação: Rafael Xavier Martins.
TCC (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) - UFPB/CCEN.

1. Acetilcolinesterase. 2. Lactato desidrogenase. 3. Neurotoxicidade. 4. Peixe-zebra. I. Farias, Davi Felipe. II. Martins, Rafael Xavier. III. Título.

UFPB/CCEN CDU 57(043.2)

Elaborado por Josélia Maria Oliveira da Silva - CRB-15/113

Dedico esta monografia à minha família e aos meus amigos, que são meu alicerce; Essa conquista também é de vocês, que me sustentaram com amor e amizade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo milagre da vida e por todas as coisas e pessoas que fizeram parte da minha vida antes, durante e após essa etapa.

Agradeço à minha mãe, Maria das Graças, por todo amor, dedicação, preocupação e confiança. Por ter acreditado em mim desde sempre e por sempre ter se feito presente. Sem você, nada seria possível. Amo você. E ao meu pai, Cláudio Gonçalves, por sempre ter me transbordado de amor, por todos os mimos, as preocupações exageradas e os bons dias mais doces. Vocês são os amores da minha vida. Obrigada por sempre terem lutado por mim e comigo.

Às minhas primas e primeiras referências de irmãs, Ana Cecília e Luana, por todo apoio emocional durante toda a minha vida, por se fazerem presentes mesmo com uma distância de mais de 2 mil km, por se alegrarem com as minhas conquistas e sentirem as minhas dores, tudo seria mais difícil sem vocês, amo vocês eternamente.

À minha avó materna, Eliza, por todo amor e conselhos. À minha avó paterna, Doraci, por todo amor, cuidado e confiança e ao meu amado avô Ariolino (*in memoriam*) por tanto amor, carinho e por sempre ter vivido esse sonho junto comigo. Sinto sua falta todos os dias.

Agradeço à Camila, por ter sido minha amiga, irmã e até mãe em alguns momentos e meu porto seguro em muitas situações, por ter me apresentado João Pessoa e feito eu me sentir em casa. Sem você tudo seria mais difícil. Amo você. Saudades do seu macarrão com camarão e molho branco.

Agradeço aos meus melhores amigos Karol e Matheus, por todos os rolês, noites de jogos, memes e aventuras. Obrigada por sempre me apoiarem, as conversas no grupo alegram os meus dias. Amo vocês.

Agradeço à minha tia Cristiana, por me proporcionar tantos momentos felizes, por todo amor, atenção e pelo imenso cuidado. A senhora sempre foi como uma segunda mãe. Amo você.

À minha tia Michelly, por todo amor, carinho e finais de semana juntas. A senhora contribuiu para a minha infância ser ainda mais feliz. Amo você.

À minha amiga Ilana, por todas as risadas, amor e excesso de proteção. Você é incrível.

Agradeço à minha tia Helena Rita, prima Caroline e Theozinho, por todos os momentos de alegria e união, por todo carinho e por sempre terem acreditado em mim. Vocês moram no meu coração.
Aos meus amigos de turma, Kayo, Felipe, Melissa, Florentino e Guilherme, por todas as conversas, risadas, trabalhos em grupo e almoço, sou eternamente grata por ter conhecido vocês.
À minha melhor amiga de vida, Ana Caroline, por todos os momentos juntas, conversas, risadas e conselhos. Você foi um presente na minha vida, estou extremamente ansiosa para o seu casamento. Te amo.
À minha amiga e vizinha Maúna, por todos os mimos, passeios e por amar Pudim mesmo não gostando de gato. Amo você.
À minha afilhada Iane, por alegrar a minha vida, por todos os abraços, por amar mexer no meu cabelo. Amo você, pequena.
Ao meu amigo Romero, por todo apoio, por todos os momentos juntos, por nunca ter desistido (em vários sentidos) você é muito especial. Obrigada por saber me fazer rir até nos piores momentos.
À minha amiga Mariana, por sempre ter acreditado em mim, por se fazer presente mesmo com a distância, por todas as mensagens de carinho e por ter me dado o melhor presente de todos, minha sobrinha Maria Valentina e Louís Miguel.
Ao meu filho felino, Pudim, por todas as tentativas de ronronar, sempre me receber na porta, por todas as noites grudadinhos, companhia diária. Minha vida ficou mais colorida com você.
À todos os meus colegas de laboratório, em especial a Cleyton, Rafael e Juliana, por terem me ajudado tanto, me apoiado e acreditado em mim.
Ao meu orientador, professor Davi, por todo carinho, apoio acadêmico e emocional. Obrigada por ter acreditado em mim, mesmo quando eu não acreditei.
Agradeço a UFPB, Centro, Coordenação do Curso e servidores pela estrutura cedida e apoio. Em especial ao Sr. Bosco e Dione, por todos os ensinamentos e momentos de descontração.
À todos os professores que ministraram suas disciplinas com prazer e honra.

E, por fim, a minha cantora preferida e amiga de alma Taylor Swift, por ter escrito as melhores músicas as quais me acompanharam em todos os momentos. Muito obrigada!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - À direita, estrutura química do herbicida 2,4-D, à esquerda, seu metabólito 2,4-DCP. Criada com Marvin Sketch 25.3.3.

Figura 2 - Diagrama de Venn ilustrando os alvos relacionados ao 2,4-DCP (em azul) e a Neurotoxicidade (em rosa) e a quantidade de genes em comum.

Figura 3 - Rede de Interação Proteína - Proteína (IPP) de alvos do 2,4-DCP relacionados com neurotoxicidade. Cada nó representa um gene e as linhas são as conexões. A diferença de tamanho está relacionada com a quantidade de conexões que cada gene realiza (k) e a diferença de tonalidade está relacionada ao grau de centralidade de intermediação (BC).

Figura 4 - Os 10 principais alvos da rede IPP, classificados por MCC por meio do programa Cytoscape 3.10.3. A diferença de tonalidade está relacionada ao MMC (BC).

Figura 5 - Análise das vias *reactome* associadas aos alvos do 2,4-DCP relacionados à neurotoxicidade. O gráfico apresenta as 30 principais vias enriquecidas, classificadas de acordo com o valor de FDR-valor.

Figura 6 - Análise das vias de GO associadas aos alvos do 2,4-DCP relacionados à neurotoxicidade. As 30 principais vias das categorias de Processos Biológicos, Função Molecular e Componente Celular. Baseado no FDR-valor.

Figura 7. Mapa de calor do *docking* molecular do 2,4-DCP com os alvos associados a neurotoxicidade e seus controles, obtidos a partir da análise da rede PPI. O eixo X representa os controles e o 2,4-DCP e o eixo Y os alvos moleculares. A escala de cor representa a energia de ligação de cada ligação.

Figura 8. *Docking* molecular do 2,4-DCP com as macromoléculas EGFR (A); ERBB2 (B); ERBB4 (C); GRB2 (D); PIK3R1 (E); PTPN11 (F); SRC (G). As imagens da esquerda representam as interações entre o 2,4-DCP (em verde) e resíduos de aminoácidos da macromolécula de interesse (em rosa), enquanto as imagens da direita representam a interação entre a macromoléculas e seus ligantes originais.

Figura 9. Atividade da enzima GST em cérebros de peixes expostos ao 2,4-DCP, utilizada como biomarcador de toxicidade.

Figura 10. Atividade da enzima GPX em cérebros de peixes expostos ao 2,4-DCP, utilizada como biomarcador de toxicidade.

Figura 11. Atividade da enzima LDH em cérebros de peixes expostos ao 2,4-DCP, utilizada como biomarcador de toxicidade.

Figura 12. Atividade da enzima AChE em cérebros de peixes expostos ao 2,4-DCP, utilizada como biomarcador de toxicidade.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise das medidas topológicas da rede IPP do 2,4-DCP relacionado com neurotoxicidade por meio da ferramenta Network Analyzer presente no Cytoscape 3.10.3. k: grau; BC: “Betweenness Centrality”; CC: “Closeness Centrality”; ASPL: “Average Shortest Pathway Length”.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: Porcentagem

2,4-D: Ácido Diclorofenoxiacético

2,4-DCP: 2,4-Diclorofenol

Å: Angstrom

α: Alfa

AChE: Acetilcolinesterase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APP: Proteína Precursora Amilóide (do inglês *Amyloid Precursor Protein*)

ASLP: Comprimento médio do caminho mais curto (do inglês *Average Shortest Path Length*)

BC: Centralidade de intermediação (do inglês *Betweenness Centrality*)

BP: Processo Biológico (do inglês *Biological process*)

CC: Centralidade de proximidade (do inglês *Closeness Centrality*)

CC-GO: Componente Celular (do inglês *Cellular Component*)

ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica

ERBB2: Erb-B2 Receptor Tirosina Cinase 4 (do inglês Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2)

ERBB4: Erb-B2 Receptor Tirosina Cinase 4 (do inglês Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4)

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

FDR: Taxa de falsos positivos (do inglês *False Discovery Rate*)

GO: Ontologia genética (do inglês *Gene Ontology*)

GPx: Glutationa Peroxidase

GRB2: Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento (no inglês *Growth Factor Receptor Bound Protein 2*)

GSH: Glutationa Reduzida

GST: Glutationa-S-Transferase

IARC: Agência Nacional de Pesquisa em Câncer

INCA: Instituto Nacional de Câncer

k: Grau de conectividade

LDH: Lactato Desidrogenase

MAPK: Proteína Cinase Dependente de Mitógeno (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MCC: Centralidade de Clique Máximo (do inglês *Maximal Clique Centrality*)

MF: Função molecular (do inglês *Molecular Function*)

OIT: Organização Internacional do Trabalho

OMS: Organização Mundial da Saúde

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

PAHs: Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (do inglês *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)

PPI: Proteína-Proteína

PIK3R1: Subunidade reguladora 1 da fosfatidilinositol 3-cinase (no inglês *Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1*)

PSMB1: Subunidade Beta 1 do Proteassoma 20S (do inglês *Proteasome 20S Subunit Beta 1*)

PSMB2: Subunidade Beta 2 do Proteassoma 20S (do inglês *Proteasome 20S Subunit Beta 2*)

PSMB9: Subunidade Beta 9 do Proteassoma 20S (do inglês *Proteasome 20S Subunit Beta 9*)

PTPN11: Proteína Tirosina Fosfatase não Receptora Tipo 11 (no inglês Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11)

RTKs: Receptores Tirosina Cinase (do inglês *Tyrosine Kinase Receptors*)

1. Introdução **15**
2. Referencial teórico **18**
2.1. Agrotóxicos 18
2.2. 2,4-DCP e seus efeitos em organismos não-alvo 20
2.3. Toxicologia de rede 21
2.4. *Docking* molecular 22
2.5. Biomarcadores de estresse oxidativo e neurotoxicidade 22
2.6. Peixe-Zebra 23
3. Objetivos **25**
3.1. Objetivo geral 25
3.2. Objetivos específicos 25
4. Metodologia **26**
4.1. Estrutura química e predição dos alvos potenciais do 2,4-DCP 26
4.2 Identificação dos genes associados a neurotoxicidade 26
4.3 Construção e análise da rede de interação proteína-proteína 27
4.4 Análise de enriquecimento 27
4.5 *Docking* molecular 28
4.6. Cérebros de peixe-zebra expostos ao 2,4-DCP 28
4.7. Biomarcadores enzimáticos 29
4.8. Análise estatística 30
5. Resultados e discussão **31**
5.1. Alvos do 2,4-DCP relacionados com neurotoxicidade 31
5.2. Análises das vias *Reactome* e *GO* 41
5.2.1. Análise das vias *Reactome* 41
5.5. Biomarcadores enzimáticos 49
6. Conclusão **54**
Referências **55**

Resumo

O uso de agrotóxicos na agricultura moderna é considerado essencial, mas sua introdução no Brasil, a partir da década de 1980, ocorreu sem pleno conhecimento dos possíveis efeitos tóxicos para os consumidores e para o meio ambiente. Dentre os agrotóxicos mais usados no país, está o herbicida 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), classificado pela OMS como moderadamente perigoso. No ambiente, o 2,4-D pode ser degradado em seu principal metabólito, o 2,4-Diclorofenol (2,4-DCP), que também é subproduto de outros clorofenóis bastante utilizados (p.ex. triclosan). Por este motivo, o 2,4-DCP tem sido frequentemente detectado em amostras ambientais, o que levanta uma preocupação acerca dos seus riscos à saúde humana e ambiental. Nesse contexto, ensaios de toxicidade utilizando modelos alternativos, como o peixe- zebra (*Danio rerio*) e de abordagens *in silico* têm se mostrado ferramentas promissoras. Dado o exposto, o presente estudo objetivou investigar os efeitos neurotóxicos do 2,4-DCP, utilizando abordagem integrada de toxicologia de rede, análises de interação molecular e testes com peixe-zebra. Para tanto, foram feitas análises de rede Interação Proteína-Proteína (IPP), *docking* molecular e determinação de biomarcadores enzimáticos (GST, GPX, LDH e AChE) em cérebros de *D. rerio*, expostos de forma crônica (21 dias) ao 2,4-DCP. A análise *in sílica* revelou 275 genes compartilhados entre o 2,4-DCP e a neurotoxicidade, sendo a rede IPP estruturada em 52 nós interligados por 70 conexões. A análise topológica (MCC) permitiu a classificação dos 10 principais alvos da rede: ERBB2, ERBB4, EGFR, GRB2, PIK3R1, PTPN11, SRC, PSMB1, PSMB2, PSMB9. A avaliação de vias *Reactome* e *GO* indicou envolvimento em transdução de sinal, resposta celular a substâncias orgânicas, atividade de receptores nucleares e atuação no lúmen de organelas intracelulares. Por sua vez, os ensaios de *docking* molecular mostraram afinidades variando entre -3,7 para a interação entre 2,4-DCP e PTPN11 e -5,7 kcal/mol para interação entre 2,4-DCP e SRC. Os ensaios enzimáticos revelaram tendência à redução da atividade de GST e GPX nos cérebros dos peixes expostos ao 2,4-DCP, além de uma diminuição significativa da atividade de LDH e AChE na concentração mais baixa testada (30 µg/L). Isto evidencia impactos relevantes do 2,4-DCP sobre o metabolismo e função neuronal. Em conjunto, os resultados destacam a necessidade de incluir o 2,4-DCP na lista de agrotóxicos a serem monitorados em amostras de água potável no Brasil, bem como a importância de novos estudos para aprofundar o conhecimento sobre seus efeitos tóxicos e sua relação com o desenvolvimento de doenças.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, lactato desidrogenase, neurotoxicidade; peixe-zebra.

Abstract

The use of pesticides in modern agriculture is considered essential, but their introduction in Brazil, starting in the 1980s, occurred without full knowledge of the possible toxic effects on consumers and the environment. Among the most widely used pesticides in the country is the herbicide 2,4- dichorophenoxyacetic (2,4-D), classified by the WHO as moderately hazardous. In the environment, 2,4-D can be degraded into its main metabolite, 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP), which is also a byproduct of other widely used chlorophenols (e.g., triclosan). For this reason, 2,4- DCP has been frequently detected in environmental samples, raising concerns about its risks to human and environmental health. In this context, toxicity assays using alternative models, such as zebrafish (*Danio rerio*), and in silico approaches have proven to be promising tools. Given this background, the present study aimed to investigate the neurotoxic effects of 2,4-DCP using an integrated approach of network toxicology, molecular interaction analyses, and zebrafish testing. For this purpose, Protein-Protein Interaction (PPI) network analysis, molecular docking, and determination of enzymatic biomarkers (GST, GPX, LDH, and AChE) were carried out in brains of D. rerio chronically exposed (21 days) to 2,4-DCP. The in silica analysis revealed 275 genes shared between 2,4-DCP and neurotoxicity, with the PPI network structured into 52 nodes interconnected by 70 edges. Topological analysis (MCC) allowed the classification of the 10 main network targets: ERBB2, ERBB4, EGFR, GRB2, PIK3R1, PTPN11, SRC, PSMB1, PSMB2, and PSMB9. Reactome and GO pathway evaluation indicated involvement in signal transduction, cellular response to organic substances, nuclear receptor activity, and functions in the lumen of intracellular organelles. Molecular docking assays showed binding affinities ranging from -3.7 for the interaction between 2,4-DCP and PTPN11 to -5.7 kcal/mol for the interaction between 2,4-DCP and SRC. Enzymatic assays revealed a trend toward reduced GST and GPX activity in the brains of fish exposed to 2,4-DCP, as well as a significant decrease in LDH and AChE activity at the lowest concentration tested (30 µg/L). This provides evidence of relevant impacts of 2,4-DCP on metabolism and neuronal function. Altogether, the results highlight the need to include 2,4-DCP in the list of pesticides to be monitored in drinking water samples in Brazil, as well as the importance of further studies to deepen the understanding of its toxic effects and its relationship with disease development.

Keywords: Acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase, neurotoxicity; zebrafish.

1. Introdução

O uso de agrotóxicos é considerado indispensável na agricultura moderna, tendo sido intensificado a partir da década de 1950, durante a chamada “Revolução Verde". Nesse período pós-Segunda Guerra Mundial, as empresas de produtos químicos enxergaram na crise agrícola uma oportunidade de destinar os venenos produzidos. Assim, os agrotóxicos chegaram como solução para a fome, passando a ser denominados de defensivos agrícolas (Salomão *et al.,* 2019).

Esses produtos chegaram ao Brasil por volta da década de 1980, tendo o seu uso intensamente incentivado pelo governo, sem a preocupação ou conhecimento dos possíveis efeitos que esses produtos trariam para a saúde do agricultor, consumidor ou para o meio ambiente (Salomão *et al.,* 2019). Atualmente, o Brasil se apresenta como um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos (Campos *et al*., 2021).

A contaminação por agrotóxico pode acontecer de diferentes formas, como o manuseio do produto, consumo de alimento com resíduos de agrotóxicos, além das rotas ambientais por meio do solo, água e ar. Além de poder ser absorvido por diversas vias, como aérea, mucosa e pele (Gomes *et al.*, 2021). Segundo a Organização Internacional do Trabalho (OIT), são registrados em média 70 mil casos de intoxicação por agrotóxicos por ano em países em desenvolvimento (Silva, 2022).

Dentre os diversos grupos que compõem esses contaminantes estão os herbicidas, agrotóxicos utilizados no controle de plantas indesejadas no contexto agrícola. Segundo o Sindiveg (2023), os três herbicidas mais utilizados no Brasil são: (1º) glifosato, (2º) ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e (3º) mancozebe, todos sendo classificados perigosos para o meio ambiente.

Nesse viés, o 2,4-D, um herbicida do tipo auxina, amplamente usado em canaviais, plantações de soja e pastagem, foi classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como moderadamente perigoso (Classe II) (Fernández *et al.*, 2021; Sachu *et al.,* 2023). Tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas, o 2,4-D pode dar origem ao seu principal metabólito, o 2,4-diclorofenol (2,4-DCP). Essa biotransformação ocorre por meio da remoção da cadeia lateral do 2,4-D, levando a liberação do anel aromático clorado (Sachu *et al.,* 2023). É importante citar que o 2,4-

DCP é um metabólito derivado de outros clorofenóis amplamente utilizados, como é o caso do triclosan (agente bacteriostático presente em produtos de higiene pessoal). Em virtude dessa origem de muitas fontes distintas, o 2,4-DCP tem sido detectado com frequência em amostras ambientais, o que levanta uma preocupação acerca dos seus riscos à saúde humana e ambiental (Tsukazawa *et al*., 2022).

O 2,4-DCP tem sido apontado como uma substância tóxica para organismos não alvo, incluindo peixe-zebra. A maioria dos estudos realizados concentram-se em exposições agudas e apontam alterações significativas em biomarcadores de estresse oxidativo, além de evidências de neurotoxicidade, genotoxicidade e desequilíbrios metabólicos (Ma et al., 2012; Tsukazawa *et al*., 2022).

Nesse contexto, ensaios de toxicidade com modelos animais alternativos como o peixe-zebra (*Danio rerio*) têm crescido significativamente em diversas áreas da pesquisa como farmacologia, biologia do desenvolvimento, ciências veterinárias, toxicologia, entre outras. O uso extensivo desses animais se deve, principalmente, ao rápido desenvolvimento embrionário, baixo custo de criação e manutenção, quando comparado com outros animais (p.ex. roedores), alta taxa de reprodução e transparência dos embriões, permitindo observação clara de seu desenvolvimento, além de apresentar grande similaridade (cerca de 70%) com o genoma humano (Canedo *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2022). É notável também que aproximadamente 84% dos genes associados a doenças humanas, possuem pelo menos um gene equivalente em peixe-zebra (Crouzier *et al.,* 2021).

Neste cenário de métodos alternativos, análises computacionais, como toxicologia de rede e *docking* molecular, têm se tornado muito populares na avaliação de efeitos tóxicos de contaminantes ambientais. A toxicologia de rede utiliza ferramentas computacionais para mapear interações entre proteínas, vias metabólicas e genes para prever alvos moleculares e possíveis mecanismos de toxicidade (Zhang *et al*., 2015). Já o docking molecular simula o acoplamento de duas moléculas permitindo observar as interações e afinidade de ligações em comum (Agarwal e Mehrotra, 2016).

Dado o que foi exposto, faz-se importante ampliar o conhecimento sobre a toxicidade do 2,4-DCP em organismos não-alvo, numa perspectiva de avaliar a necessidade de regulamentação dos níveis ambientais desse metabólito e estimular

o desenvolvimento de novas tecnologias de remoção (filtração) desse contaminante. Para tanto, este estudo realizou análises computacionais de toxicologia rede, docking molecular e exposição de peixes-zebra adultos a diferentes concentrações de 2,4-DCP a fim de testar possíveis efeitos neurotóxicos desse importante contaminante.

2. Referencial teórico

2.1. Agrotóxicos

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), os agrotóxicos são definidos como produtos químicos sintéticos ou biológicos usados com o objetivo de matar insetos, larvas e fungos para proteger as plantações de possíveis doenças (INCA, 2022).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com o seu tipo de ação como: inseticidas, fungicidas e herbicidas, entre outros; de acordo com a sua toxicidade, podendo variar de extremamente tóxico a não classificado, e segundo o seu grupo químico como: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Esses químicos são amplamente usados na agricultura, mas podem ser encontrados em diversos ambientes como nos corpos d'água (ANVISA, 2022).

Os inseticidas são produtos normalmente de origem biológica sintetizada que são usados para repelir os insetos das plantações. Sendo suas principais formas químicas os organofosforados e carbamatos, estes, em sua maioria, atuam inibindo a acetilcolinesterase, promovendo paralisia e morte dos insetos (Camilotte, 2022). Os fungicidas, por sua vez, são produtos químicos que tem como função controlar doenças causadas por fungos, atuando na inibição dos esporos (EMBRAPA, 1999).

Os herbicidas são substâncias químicas ou biológicas que atuam controlando o crescimento de ervas daninhas (EMBRAPA, 2008). Tendo uma vasta classificação relacionada principalmente aos seus mecanismos de ação como inibidores da enzima

acetil-CoA-carboxilase (ACCase), inibidores da acetolactato-sintase (ALS), inibidores do fotossistema II, auxínicos, entre outros.

Entre os herbicidas mais utilizados no mundo e o segundo mais usado no Brasil, destaca-se o 2,4-D da classe dos ácidos fenoxiacéticos (Figura 1), que é amplamente usado no controle de plantas daninhas e culturas agrícolas, possuindo meia vida em ambientes aquáticos de 15 a 300 dias. O uso em larga escala se deve principalmente ao seu baixo custo, eficácia e solubilidade em água. Tais características o tornaram um importante contaminante ambiental, sendo encontrados em diversos corpos d'água como rios e até água da torneira ou potável (EPA, 2005; Zhu *et al*., 2022; Martins *et al.*, 2025).

Durante processos de degradação metabólica em organismos vivos, bem como em condições ambientais aeróbicas e anaeróbicas, o 2,4-D é convertido em seu principal metabólito: 2,4-DCP (Figura 1), substância considerada perigosa devido ao seu alto potencial tóxico e biocomulativo (Sachu *et al.,* 2023), uma vez que o potencial tóxico de um metabólito pode ser maior do que da substância original (Ju *et al.,* 2019).

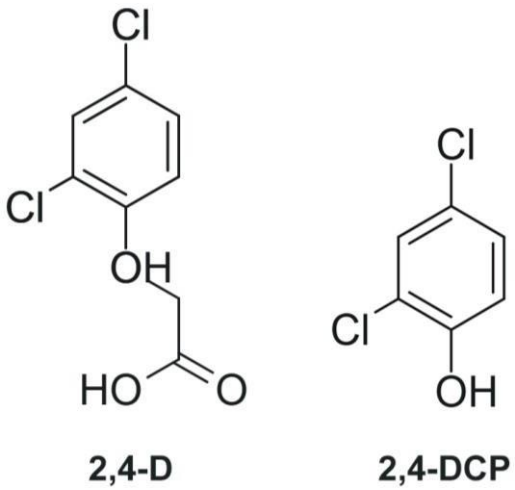

Figura 1. À direita, estrutura química do herbicida 2,4-D e, à esquerda, seu metabólito 2,4-DCP. Criada com Marvin Sketch 25.3.3

2.2. 2,4-DCP e seus efeitos em organismos não-alvo

O 2,4-DCP é um composto aromático sólido de cor branca, com pKa 7,9, pertencente ao grupo dos fenóis clorados, com fórmula molecular $C_6 H_4 Cl_2 O$. O seu caráter fenólico se dá devido sua estrutura composta por um anel benzênico com dois átomos de cloro ligados aos carbonos 2 e 4 e um grupo hidroxila ligado ao carbono na posição 1 (PubChem, 2025). Esse metabólito já foi detectado em diversas regiões do mundo, como nas águas superficiais da China em concentrações (0,01 a 19,96 µg/L), França (0–4,89 µg/L), África do Sul (0,1–10 µg/L) e Austrália (0,1–6,72 µg/L), em concentrações variadas, desde traços até níveis mais elevados que geram preocupações (Martins *et al.*, 2025).

Sua relevância como poluente é justificada em diversos aspectos. A União Europeia aponta o 2,4-DCP como uma substância com potencial desregulador endócrino, enquanto nos Estados Unidos e na China o contaminante é listado como prioritário (Coelho *et al.*, 2018). No Brasil, é classificado como extremamente tóxico (Classe I) pela Anvisa. Além disso, a Agência Nacional de Pesquisa em Câncer (IARC) junto com a OMS classificou o 2,4-D (molécula parental do 2,4-DCP) como potencialmente cancerígeno (Xi *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2018).

Os efeitos adversos do 2,4-DCP vêm sendo cada vez mais investigados devido ao seu potencial de toxicidade sistêmica. Em um estudo conduzido por Fu *et al.* (2016), foi demonstrado que a exposição aguda de camundongos ao contaminante por 12 horas induziu a fosforilação de múltiplos genes associados ao estresse do retículo endoplasmático em células hepáticas; após 24 horas, também foram observadas alterações histológicas significativas no fígado. De forma consistente, outros trabalhos evidenciaram que o 2,4-DCP exerce efeitos hepatotóxicos em organismos não-alvo, como peixes-zebra (Martins *et al*., 2025). Em nível celular, Huang *et al*. (2018) relataram que o 2,4-DCP promove estresse oxidativo no fígado de peixes dourados (*Carassius auratus*), evidenciado pela diminuição da glutationa reduzida (GSH) e pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Os efeitos tóxicos do 2,4-DCP permanecem pouco explorados quando comparados à vasta literatura existente sobre o 2,4-D. No entanto, a similaridade estrutural significativa entre essas moléculas permite que informações já

consolidadas para o 2,4-D sirvam de base para investigações envolvendo o 2,4-DCP. Isso se estende ao conhecimento do potencial neurotóxico do 2,4-D em diferentes modelos. Nesse sentido, Gaaied *et al*. (2020) demonstraram, em embriões de peixe-zebra (*D. rerio*), que mesmo concentrações subteratogênicas de 2,4-D (0,02 a 0,8 mg/L) foram suficientes para causar deformidades, inibição da colinesterase e redução da locomoção, indicando comprometimento da neurotransmissão colinérgica. Esses achados reforçam a relevância de se considerar os efeitos neurocomportamentais como marcadores de toxicidade em ambientes aquáticos.

De forma complementar, em modelos de exposição crônica, efeitos neurodegenerativos também foram descritos. Em um estudo conduzido com ratos adultos, expostos por seis meses ao 2,4-D por via oral e inalatória, observou-se redução da motilidade no teste de campo aberto e menor número de entradas no labirinto em cruz elevado em comparação aos controles, indicando déficits neurocomportamentais. Além disso, análises histopatológicas revelaram necrose neuronal associada à diminuição da espessura cortical e aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAX, o que demonstra que a desregulação da poptose desempenha papel central no surgimento dos danos cerebrais induzidos pelo herbicida (Ueda *et al.*, 2021).

Diante do exposto, torna-se necessária a realização de mais estudos voltados à análise dos efeitos neurotóxicos do 2,4-DCP, especialmente de forma crônica, uma vez que a literatura ainda carece de informações consolidadas sobre esse composto.

2.3. Toxicologia de rede

A toxicologia de rede é um campo inovador que busca compreender, através de análises computacionais, os efeitos adversos de substâncias químicas a partir de uma visão integrada, considerando as interações complexas entre moléculas, vias metabólicas, células, organismos e o ambiente. Para tal, são utilizados diversos recursos da bioinformática, como bancos de dados de vias metabólicas e sinalização celular (p.ex. *Reactome e Gene Ontology*) e diferentes ferramentas de análises de rede. Esse método utiliza modelos de rede para mapear como os agentes tóxicos

interagem e regulam processos biológicos, permitindo identificar mecanismos de toxicidade em nível sistêmico (Zhang *et al*., 2015; Zhang, 2016).

A toxicologia de rede, pode ser usada para investigar mecanismos de neurotoxicidade de organofosforados e elucidar vias afetadas por contaminantes ambientais (Martins, 2025). Desse modo, a aplicação da toxicologia de rede possibilita a compreensão dos mecanismos de toxicidade de substâncias químicas de forma eficiente, reduzindo o tempo e os custos das análises, além de minimizar a necessidade do uso de animais em experimentação.

2.4. *Docking* molecular

O *docking* molecular é uma ferramenta computacional que estuda a formação de complexos a partir da interação de duas moléculas, geralmente, um ligante menor e uma macromolécula. As informações dessas interações podem prever o perfil energético e a afinidade de ligação (Agarwal e Mehrotra, 2016).

Atualmente, o *docking* molecular tem sido amplamente utilizado em estudos toxicológicos para prever a forma como diferentes moléculas, como os xenobióticos, se comportam ao interagir com seus alvos moleculares, tais como proteínas, carboidratos ou ácidos nucleicos, permitindo estimar parâmetros de ligação relevantes e fornecendo informações para compreender os mecanismos moleculares de toxicidade. Dessa forma, o *docking* molecular também contribui para analisar potenciais efeitos tóxicos (Agarwal e Mehrotra, 2016).

2.5. Biomarcadores de estresse oxidativo e neurotoxicidade

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a capacidade do sistema de defesa antioxidante. A formação de radicais livres e/ou de espécies reativas não radicais ocorre como subproduto natural do metabolismo do oxigênio (Barbosa *et al.*, 2010). Dessa forma, o uso de biomarcadores oxidativos, como a glutationa peroxidase (GPX), a glutationa S-transferase (GST) e a lactato desidrogenase (LDH), representa um método relevante

para a análise e monitoramento do estresse oxidativo em organismos expostos a xenobióticos.

O GPX atua como uma enzima antioxidante essencial, desempenhando um papel central na neutralização de ERO's no organismo. Ele atua catalisando a redução de peróxidos de hidrogênio ($H_2 O_2$) e de hidroperóxidos orgânicos em moléculas menos tóxicas, como água ou álcoois, prevenindo assim danos celulares (Pei *et al.,* 2023).

A GST é uma enzima solúvel em água que desempenha um importante papel nos mecanismos de defesa celular contra compostos tóxicos. Sua principal função está relacionada à conjugação da glutationa reduzida (GSH) a xenobióticos, facilitando a desintoxicação e excreção de contaminantes ambientais, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e pesticidas (El-SiKaily e Shabaka, 2024).

A LDH é uma importante enzima do metabolismo anaeróbico, cuja função é a catálise da conversão reversível de lactato em piruvato com a redução de NAD^+ em NADH. Esta enzima está presente em todos os tecidos e é um importante biomarcador para verificação da gliconeogênese e do metabolismo do DNA, servindo como indicador indireto de integridade tecidual e processos de dano celular, incluindo alterações no metabolismo de ácidos nucleicos e na viabilidade celular (Farhana e Lappin, 2023).

Além dos biomarcadores oxidativos e metabólicos, a acetilcolinesterase (AChE) se destaca como um marcador neuroquímico. A enzima é responsável por interromper a transmissão nervosa por meio da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. A inibição da AChE tem sido bastante usada como um biomarcador sensível de neurotoxicidade, principalmente em casos de exposição ambiental a xenobióticos (Lionetto *et al.*, 2013).

2.6. Peixe-Zebra

O uso de animais não convencionais como o peixe zebra, tem ganhado destaque em diversas áreas da pesquisa, como biomedicina, farmacologia, medicina veterinária e toxicologia. Isso se deve a um conjunto de características que facilitam estudos em

níveis embrionário e adulto. Algumas das vantagens que podem ser citadas são: Tamanho pequeno dos peixes, que podem chegar a 5 cm na fase adulta; o curto ciclo de vida e desenvolvimento rápido, permitindo que experimentos sejam conduzidos em períodos reduzido; a transparência dos embriões, que possibilitam uma maior facilidade para visualização de alterações morfológicas na fase larval; alta taxa de fecundidade, podendo gerar centenas de ovos por semana, o que facilita a realização de experimentos com grande número de réplicas; alto nível de homologia com humanos, cerca de 75% (Chakraborty *et al*.,2016; Chahardehi *et al.,* 2020)

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos neurotóxicos do contaminante ambiental 2,4-Diclorofenol (2,4-DCP) através de uma abordagem integrativa com métodos computacionais para predição de vias e alvos moleculares, bem como análise *in vivo* de biomarcadores de toxicidade em cérebros de *D. rerio* expostos a essa substância química.

3.2. Objetivos específicos

- Construir redes de interação proteína-proteína para determinação de alvos moleculares centrais e potenciais mecanismos de ação do 2,4-DCP;
- Realizar estudos de *docking* molecular entre o 2,4-DCP e os alvos moleculares prioritários identificados, avaliando a afinidade de ligação e as interações relevantes para os possíveis efeitos neurotóxicos;
- Quantificar a atividade de biomarcadores enzimáticos relacionados ao estresse oxidativo (GPX, GST), ao metabolismo celular (LDH) e à função neuroquímica (AChE) em cérebros de peixe-zebra expostos ao 2,4-DCP.

4. Metodologia

4.1. Estrutura química e predição dos alvos potenciais do 2,4-DCP

A estrutura 2D do metabólito 2,4-DCP foi obtida através do banco de dados PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) acessado em 7 de março de 2025, bem como o código SMILES do 2,4-DCP. A estrutura 2D foi submetida ao banco de dados PharmMapper (http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/) acessado em 7 de março de 2025 , usando a opção “apenas alvos proteicos humanos”, e as outras configurações padrões, para a predição de alvos relacionados a molécula estudada. Além disso, o SMILES foi utilizado nas plataformas Swiss Target Prediction (http://www.swisstargetprediction.ch) acessado em 7 de março de 2025 e SuperPred (https://academic.oup.com/nar/article/50/W1/W726/6582165) acessado em 7 de março de 2025, para obtenção dos genes alvos. Posteriormente, todos os alvos foram submetidos ao banco de dados UniProt (https://www.uniprot.org/) acessado em 7 de março de 2025, para a padronização dos nomes. Por fim, os genes foram organizados e tiveram suas duplicatas removidas.

4.2 Identificação dos genes associados a neurotoxicidade

Para a busca dos genes relacionados a neurotoxicidade, foram usados os bancos de dados GeneCards (https://www.genecards.org/) acessado em 7 de março de 2025 e o Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, http://omim.org/) acessado em 7 de março de 2025. Para tanto, foram utilizadas as seguintes palavras chaves: *neurotoxicity*, *brain toxicity* e *brain injury*. As análises foram filtradas para *Homo sapiens*. Posteriormente, os genes obtidos também foram padronizados por meio do UniProt e suas duplicatas foram removidas.

Os genes previstos do 2,4-DCP e os genes relacionados a neurotoxicidade foram submetidos à plataforma Draw Venn Diagram (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/) acessado em 7 de março de 2025, para a identificação dos alvos potenciais do 2,4-DCP que são relacionados a neurotoxicidade. As pesquisas foram realizadas em março de 2025.

4.3 Construção e análise da rede de interação proteína-proteína

Para a construção da rede de interação proteína-proteína (IPP) foi utilizado a plataforma STRING (https://string-db.org) acessado em 7 de março de 2025, considerando a espécie *Homo sapiens*. Para tal, foi utilizada a intersecção do Diagrama de Venn, levando em consideração os alvos preditos para o composto que possuíam associação ao efeito de neurotoxicidade. Foi definido um escore de alta confiança, no mínimo 0.7, e apenas dados experimentais para fonte de interações.

Em seguida, a rede foi analisada utilizando o software Cytoscape 3.10.3 acessado em 7 de março de 2025, no qual utilizou-se a ferramenta *analyze network* para análises topológicas com o objetivo de classificar os nós da rede baseado nas métricas de centralidade: grau, centralidade de intermediação (BC – *betweenness centrality*), comprimento médio do caminho mais Curto (ASPL- *average shortest path length*), centralidade de proximidade (*closeness centrality*), agrupamento (*clustering*), grau de conectividade (k - *degree of connectivity*) . Após essa análise, utilizou-se a extensão cytoHubba 0.1, para classificar os 10 principais alvos considerando o parâmetro MCC (*Maximal Clique Centrality*). A construção da rede foi realizada em março de 2025.

4.4 Análise de enriquecimento

Os potenciais alvos de neurotoxicidade associados ao 2,4-DCP foram submetidos ao Cytoscape 3.10.3 utilizando o stringAPP 2.2.0 para a análise de enriquecimento. Dessa forma, foram investigados o *Gene Ontology* (GO) e as suas seguintes categorias: Processo Biológico (BP), Função Molecular (MF) e Componente Celular (CC), além das vias do *reactome Pathway*. Para ambos foi considerado um valor de FDR < 0,01.

Para a análise foram selecionados os 15 principais de cada categoria do *Gene Ontology* e os 30 principais do *reactome*, baseado na metodologia de Souza *et al.,* (2023). Essas vias foram então levadas ao Rstudio 2024.04.1+748, que foi usado para a construção dos gráficos através do pacote ggplot2 3.51.

4.5 *Docking* molecular

O *docking* molecular foi realizado com base em uma adaptação da metodologia descrita no trabalho de Souza *et al*. (2023). A interação entre os 7 alvos da rede IPP que apresentaram melhor resultado na classificação por MCC e o metabólito 2,4-DCP foram avaliadas por *docking* molecular.

Inicialmente, foi obtida a estrutura 3D do ligante (2,4-DCP) através da base de dados PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) acessado em 9 de agosto de 2025. Posteriormente, foram obtidas as estruturas 3D dos alvos de interesse (ERBB2, EGFR, GRB2, PIK3R1, PTPN11, ERBB4 e SRC) através da base de dados PDB (https://www.rcsb.org/) e de seus ligantes. As proteínas foram encaminhadas para o software Discovery Studio 21.1.0. (BIOVIA, La Jolla, EUA), para preparação inicial, no qual foram removidas as moléculas de água e adicionados hidrogênios polares. Em sequência, através do programa Swiss-PdbViewer 4.1.0, a energia global das proteínas foi minimizada. Por fim, as proteínas foram levadas ao software Autodock Tools 1.5.6. (CCSB, La Jolla, EUA), no qual foi feita a adição de cargas de Gasteiger de modo a simular o potencial eletrostático das macromoléculas em estudo.

O *docking* molecular foi realizado através do software Autodock Vina 1.2.6 (CCSB, La Jolla, EUA), usando as coordenadas moleculares extraídas dos ligantes presentes nas estruturas cristalográficas obtidas. Além disso, as dimensões da “gridbox” foram definidas como 20x20x20 Å. Para análise comparativa, foram utilizados como ligantes padrão os ligantes presentes nas estruturas cristalográficas.

A avaliação das interações e a confecção das imagens foram realizadas no Discovery Studio.

4.6. Cérebros de peixe-zebra expostos ao 2,4-DCP

Cérebros (n = 5/grupo) de peixes-zebra adultos expostos de forma crônica ao 2,4-DCP em diferentes concentrações foram provenientes do estudo de Martins e colaboradores (dados não publicados), que avaliaram os impactos do 2,4-D e de seu metabólito, 2,4-DCP, sobre a saúde hepática dos animais. Após um período de adaptação às condições experimentais, peixes-zebra adultos da linhagem AB, com 4 meses de idade, foram redistribuídos aleatoriamente e alocados em grupos de 10

indivíduos em 6 tanques contendo 8,0 L de solução de exposição. Os grupos foram organizados em três tratamentos, conduzidos em duplicata: (i) Controle (água declorada), (ii) Low (30 µg/L de 2,4-DCP) e (iii) High (300 µg/L de 2,4-DCP). As soluções teste foram preparadas a partir da solubilização do 2,4-DCP em água declorada para a concentração desejada.

A exposição durou 3 semanas (i.e. 21 dias). Os tanques foram mantidos em uma sala com condições controladas (26 ± 1 °C; fotoperíodo de 14 claro e 10 escuro), com monitoramento diário de pH e dos níveis de amônia e nitrito. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (ColorBits, Tetra, Melle, Alemanha) e receberam suplementação com náuplios de artêmia três vezes por semana. As soluções de exposição foram totalmente renovadas a cada três dias para assegurar a manutenção das concentrações nominais do 2,4-DCP e o controle dos níveis de nitrito e amônia. Adicionalmente, realizou-se monitoramento diário para detecção de mortalidade e possíveis alterações comportamentais. Ao término da exposição, os animais foram eutanasiados com óleo de cravo (1,5 mL/L) e, então, tiveram os órgãos de interesse dissecados.

Foram selecionados aleatoriamente 5 cérebros de peixes-zebra de cada tratamento e, então, guardados de forma individual em microtubos de 1,5 mL, à - 20 °C, até o momento das análises.

4.7. Biomarcadores enzimáticos

Para análise da atividade das enzimas biomarcadores de toxicidade, os cérebros foram descongelados em banho de gelo e, em seguida, macerados com o auxílio de um pistilo de polipropileno. Os homogenatos foram centrifugados à 10.000 x g, por 10 min., 4 °C. O precipitado foi descartado, enquanto os sobrenadantes foram utilizados para as análises.

Primeiramente, foi realizada a quantificação de proteínas solúveis através do método desenvolvido por Bradford (1976), modificado para microplacas de 96 poços. Para tanto, uma curva padrão com albumina sérica bovina foi construída e a absorbância das amostras foi lida em um comprimento de onda de 595 nm, utilizando

a leitora de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Oy, Finlândia). As leituras foram feitas em quadruplicata.

O procedimento para determinação das atividades da LDH e GST é descrito por Domingues *et al.*, (2010), enquanto a atividade de GPx foi medida de acordo com Martins *et al*. (2024). Todas as metodologias se baseiam em quantificação fotocolorimétrica de produtos oriundos formados por reações específicas catalisadas por cada uma das enzimas testadas. Os testes foram feitos em quadruplicatas para cada teste.

4.8. Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A normalidade dos dados obtidos nos tratamentos e nos controles foi inicialmente avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, dados que seguiram distribuição normal foram analisados por one-way ANOVA e, posteriormente, por teste post-hoc de Tukey. Dados que não seguiram distribuição normal foram analisados por teste de Kruskal-Wallis, seguido por teste post-hoc de Dunn. Todos os testes realizados usaram $p < 0,05$.

5. Resultados e discussão

5.1. Alvos do 2,4-DCP relacionados com neurotoxicidade

Após a padronização realizada no Uniprot e a remoção das duplicatas, ao todo foram encontrados 893 genes provenientes do Swiss Target Prediction relacionados com o 2,4-DCP e 13.134 foram encontrados através do GeneCards e OMIM relacionados com neurotoxicidade. No diagrama de Venn foram identificados 275 genes em comum entre 2,4-DCP e neurotoxicidade (Figura 2). Esses foram utilizados para a construção da rede IPP através da plataforma STRING, que posteriormente foram submetidos ao programa Cytoscape para serem visualizados e analisados.

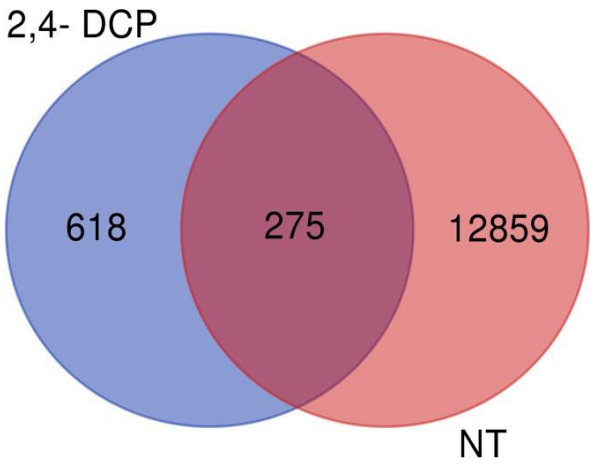

Figura 2. Diagrama de Venn mostrando os números de alvos gênicos associados ao 2,4-DCP e a neurotoxicidade (NT), bem como sua interseção com a quantidade de genes em comum.

A análise do programa revelou que a rede IPP é composta por 52 nós e 70 ligações (Figura 3). Posteriormente, foi realizada análise da topologia de rede através do programa Network Analyzer (Tabela 1). A partir da classificação através do parâmetro MCC foi possível identificar os 10 principais alvos: Erb-B2 Receptor Tirosina Cinase 2 (ERBB2), Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), Proteína 2 Ligadora ao Receptor do Fator de Crescimento (GRB2), Subunidade Reguladora 1 da Fosfatidilinositol-3-Cinase (PIK3R1), Fosfatase de Proteína Tirosina

Não Receptora Tipo 11 (PTPN11), Erb-B2 Receptor Tirosina Cinase 4 (ERBB4), SRC Proto-Oncogene, Tirosina Cinase Não Receptora (SRC), Subunidade Beta 1 do Proteassoma 20S (PSMB1), Subunidade Beta 2 do Proteassoma 20S (PSMB2) e Subunidade Beta 9 do Proteassoma 20S (PSMB9) (Figura 4). Três genes se destacaram por apresentarem o maior grau de centralidade de cliques máximos: EGFR, ERBB2 e GRB2. Os dois primeiros pertencem à família dos receptores tirosina-cinase (RTKs). O GRB2, por sua vez, não é um receptor, mas um adaptador essencial na sinalização, presente na via MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), uma via importante para eventos de proliferação e diferenciação celular (Silva, 2024).

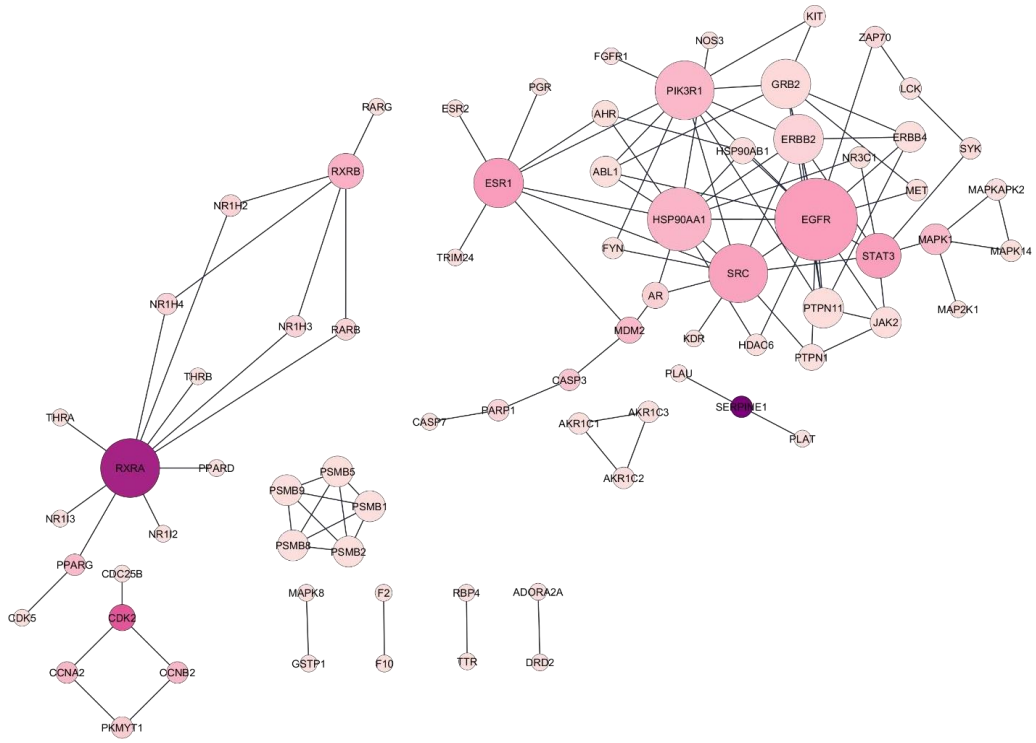

Figura 3. Rede de Interação Proteína - Proteína (IPP) de alvos do 2,4-DCP relacionados com neurotoxicidade. Cada nó representa um gene e as linhas são as conexões. A diferença de tamanho está relacionada com a quantidade de conexões que cada gene realiza (k) e a diferença de tonalidade está relacionada ao grau de centralidade de intermediação (BC).

Protéina	Nó	ASPL	BC	CC	Coeficiente de agrupamento	k
Receptor Beta do Hormônio da Tireoide	THRB	2,231	0,000	0,448	0,000	1
Receptor Alfa do Hormônio da Tireoide	THRA	2,231	0,000	0,448	0,000	1
Transtirretina	TTR	1,000	0,000	1,000	0,000	1
Proteína Ligadora de Retinol 4	RBP4	1,000	0,000	1,000	0,000	1
Receptor Gama do Ácido Retinoico	RARG	3,154	0,000	0,317	0,000	1
Receptor Beta do Ácido Retinoico	RARB	1,923	0,051	0,520	0,000	2
Subunidade Beta 5 do Proteassoma 20S	PSMB5	1,000	0,000	1,000	1,000	4
Subunidade Beta 2 do Proteassoma 20S	PSMB2	1,000	0,000	1,000	1,000	4
Subunidade Beta 8 do Proteassoma 20S	PSMB8	1,000	0,000	1,000	1,000	4
Subunidade Beta 9 do Proteassoma 20S	PSMB9	1,000	0,000	1,000	1,000	4
Subunidade Beta 1 do Proteassoma 20S	PSMB1	1,000	0,000	1,000	1,000	4
Receptor Delta Ativado por Proliferadores de Peroxissoma	PPARD	2,231	0,000	0,448	0,000	1
Ativador do Plasminogênio, Uroquinase	PLAU	1,500	0,000	0,667	0,000	1
Serina Protease Inibidora Família E Membro 1	SERPINE1	1,000	1,000	1,000	0,000	2

Protéina	Nó	ASPL	BC	CC	Coeficiente de agrupamento	k
Ativador do Plasminogênio, Tipo Tecidual	PLAT	1,500	0,000	0,667	0,000	1
Receptor Nuclear Subfamília 1, Grupo I, Membro 3	NR1I3	2,231	0,000	0,448	0,000	1
Receptor Nuclear Subfamília 1, Grupo I, Membro 2	NR1I2	2,231	0,000	0,448	0,000	1
Receptor Nuclear Subfamília 1, Grupo H, Membro 4	NR1H4	1,923	0,051	0,520	0,000	2
Receptor Nuclear Subfamília 1, Grupo H, Membro 3	NR1H3	1,923	0,051	0,520	0,000	2
Receptor X de Retinoide Alfa	RXRA	1,308	0,833	0,765	0,000	10
Receptor X de Retinoide Beta	RXRB	2,231	0,192	0,448	0,000	5
Receptor Nuclear Subfamília 1 Grupo H Membro 2	NR1H2	1,923	0,051	0,520	0,000	2
Mitogen-Ativada Quinase de Proteína 14	MAPK14	4,027	0,000	0,248	1,000	2
Proteína Quinase 2 Ativada pela MAPK	MAPKAPK2	4,027	0,000	0,248	1,000	2
Quinase Ativada por Proteína Mitógena 1	MAPK1	3,081	0,156	0,325	0,167	4
Quinase da Quinase da Proteína da Mitogen-Ativada	MAP2K1	4,054	0,000	0,247	0,000	1
Quinase de Tirosina Associada ao Baço	SYK	3,162	0,016	0,316	0,000	2
Proto-oncogene LCK, Quinase de Tirosina da Família Src	LCK	3,676	0,002	0,272	0,000	2

Protéina	Nó	ASPL	BC	CC	Coeficiente de agrupamento	k
Receptor de Quinase com Domínio de Inserção	KDR	2,973	0,000	0,336	0,000	1
Sintase de Óxido Nítrico 3	NOS3	3,135	0,000	0,319	0,000	1
Receptor Nuclear Subfamília 3 Grupo C Membro 1	NR3C1	2,757	0,006	0,363	0,000	2
Quinase ativada por proteína mitogênica 8	MAPK8	1,000	0,000	1,000	0,000	1
Glutationa S-Transferase Pi 1	GSTP1	1,000	0,000	1,000	0,000	1
Proto-Oncogene KIT, Receptor Tirosina Quinase	KIT	3,081	0,000	0,325	1,000	2
Proto-Oncogene FYN, Tirosina Quinase da Família Src	FYN	2,811	0,000	0,356	1,000	2
Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos 1	FGFR1	3,162	0,000	0,316	0,000	1
Fator de Coagulação II, Trombina	F2	1,000	0,000	1,000	0,000	1
Fator de Coagulação X	F10	1,000	0,000	1,000	0,000	1
Receptor de Estrogênio 2	ESR2	3,216	0,000	0,311	0,000	1
Tripartite Motif Contendo 24	TRIM24	3,216	0,000	0,311	0,000	1
Receptor de Progesterona	PGR	3,216	0,000	0,311	0,000	1
Fosfatase de Tirosina Proteica Não-Receptora Tipo 11	PTPN11	2,568	0,008	0,389	0,667	6

Protéina	Nó	ASPL	BC	CC	Coeficiente de agrupamento	k
Fosfatase de Tirosina Proteica Não-Receptora Tipo 1	PTPN1	2,649	0,004	0,378	0,667	3
Proto-oncogene MET, Receptor Tirosina Quinase	MET	2,946	0,000	0,339	1,000	2
Receptor Tirosina Quinase Erb-B2 4	ERBB4	2,892	0,000	0,346	1,000	4
Quinase Janus 2	JAK2	2,757	0,007	0,363	0,500	4
Histona Desacetilase 6	HDAC6	2,649	0,000	0,378	1,000	2
Quinase Receptora de Tirosina Erb-B2 2	ERBB2	2,243	0,049	0,446	0,536	8
Quinase 70 Associada à Cadeia Z do Receptor de Células T	ZAP70	2,919	0,036	0,343	0,000	2
Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3	STAT3	2,270	0,268	0,440	0,190	7
Receptor Gama Ativado por Proliferador de Peroxissoma	PPARG	2,077	0,154	0,481	0,000	2
Quinase Dependente de Ciclina 5	CDK5	3,000	0,000	0,333	0,000	1
Ciclo da Divisão Celular 25B	CDC25B	2,000	0,000	0,500	0,000	1
Ciclina B2	CCNB2	1,500	0,167	0,667	0,000	2
Quinase Dependente de Ciclina 2	CDK2	1,250	0,583	0,800	0,000	3
Quinase Proteica Associada à Membrana, Tirosina/Treonina 1	PKMYT1	1,750	0,083	0,571	0,000	2
Ciclina A2	CCNA2	1,500	0,167	0,667	0,000	2

Protéina	Nó	ASPL	BC	CC	Coeficiente de agrupamento	k
Caspase 7	CASP7	5,757	0,000	0,174	0,000	1
Polimerase de Poli(ADP-Ribose) 1	PARP1	4,784	0,054	0,209	0,000	2
Caspase 3	CASP3	3,865	0,105	0,259	0,000	2
Proto-oncogene SRC, quinase tirosina não receptor	SRC	2,000	0,254	0,500	0,267	10
Proto-oncogene MDM2	MDM2	3,000	0,155	0,333	0,000	3
Receptor de Andrógeno	AR	2,568	0,061	0,389	0,333	3
Membro C2 da Família 1 de Redutases Aldo-Queto	AKR1C2	1,000	0,000	1,000	1,000	2
Membro C3 da Família 1 de Redutases Aldo-Queto	AKR1C3	1,000	0,000	1,000	1,000	2
Membro C1 da Família 1 de Redutases Aldo-Queto	AKR1C1	1,000	0,000	1,000	1,000	2
Membro 1 da Classe B da Família de Proteínas de Choque Térmico 90 Alfa	HSP90AB1	2,622	0,007	0,381	0,667	3
Receptor de Estrogênio 1	ESR1	2,243	0,282	0,446	0,107	8
Receptor de Hidrocarboneto Aromático	AHR	2,811	0,005	0,356	0,667	3
Receptor de Dopamina D2	DRD2	1,000	0,000	1,000	0,000	1
Receptor de Adenosina A2a	ADORA2A	1,000	0,000	1,000	0,000	1
Proteína 2 Ligada ao Receptor de Fator de Crescimento	GRB2	2,514	0,027	0,398	0,464	8
Subunidade Reguladora 1 da Fosfoinositídeo-3-Quinase	PIK3R1	2,189	0,165	0,457	0,289	10

Protéina	Nó	ASPL	BC	CC	Coeficiente de agrupamento	k
Proteína de Choque Térmico 90, Família Alfa, Classe A, Membro 1	HSP90AA1	2,162	0,179	0,462	0,182	11
Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico	EGFR	2,027	0,274	0,493	0,238	15
Quinase de Tirosina Não Receptora	ABL1	2,514	0,004	0,398	0,667	4

Tabela 1. Análise das medidas topológicas da rede IPP do 2,4-DCP relacionado com neurotoxicidade por meio da ferramenta Network Analyzer presente no Cytoscape 3.10.3.

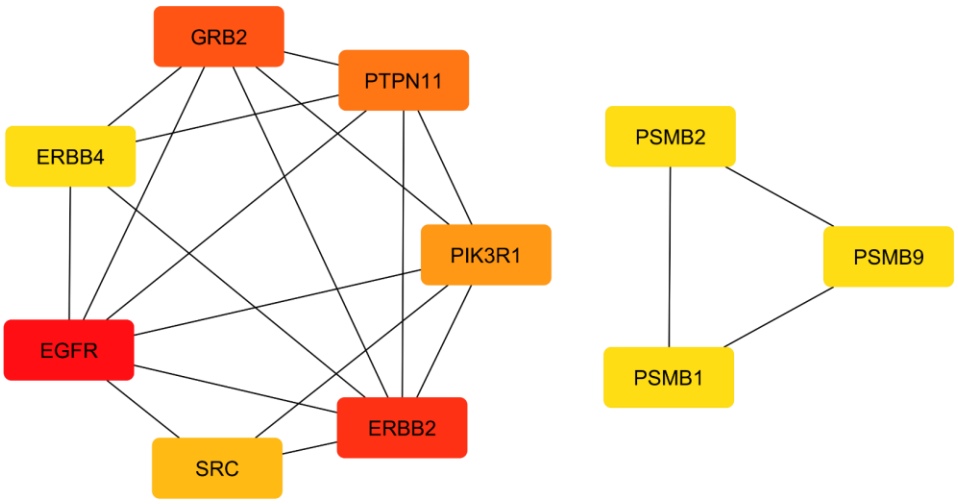

Figura 4. Os 10 principais alvos da rede IPP para o 2,4-DCP e neurotoxicidade, classificados por MCC por meio do programa Cytoscape 3.10.3. A diferença de tonalidade está relacionada ao MMC(BC). MCC: *Maximal Clique Centrality;* BC: *Betweenness Centrality*.

O EGFR é um receptor tirosina cinase que atua como regulador essencial em processos de crescimento, diferenciação, manutenção, reparo tecidual e embriogênese, além de ser um fator determinante na tumorigênese quando desregulado. No sistema nervoso, atua com função de manutenção. A perda de atividade do EGFR em astrócitos compromete sua morfologia e sua capacidade de sustentar os neurônios, o que leva à degeneração progressiva, especialmente em regiões como o córtex cerebral. Também atua na maturação de oligodendrócitos e na formação da mielina de forma que alterações nesse receptor podem levar a degeneração da substância branca. Sua desregulação também está associada a doenças neurodegenerativas (Romano e Bucci, 2020). A superexpressão ou ativação desregulada do EGFR contribui para a acumulação de α-sinucleína e para a astrogliose, que agravam a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra, processos característicos da doença de Parkinson (Mansour *et al.*, 2024). Já na Doença de Alzheimer, sua ativação elevada, observada em modelos experimentais, demonstrou contribuir para o comprometimento da memória, neurotoxicidade, ativação de astrócitos e neuroinflamação. Além disso, em pacientes com a condição, o EGFR é encontrado em placas neuríticas no córtex e hipocampo que são características da doença (Choi *et al.*, 2023).

O ERBB2 e ERBB4, são membros da família ErbB de receptores tirosina cinase da subfamília do receptor do fator de crescimento epidérmico, cuja suas funções de supressão tumoral são bastante conhecidas (Mill *et al.*, 2011). No sistema nervoso, o ERBB2 atua como receptor essencial para a sinalização mediada pelo NRG1. Quando o NRG1 se liga aos receptores ERBB3 ou ERBB4, eles dimerizam com ERBB2, ativando as vias Akt e ERK. Essa ativação regula a mielinização, o crescimento de neuritos, a proliferação e diferenciação celular, além de fornecer proteção contra a apoptose (Liao *et al.,* 2018). Um estudo realizado por Pankratova *et al.* (2018), destaca que o receptor ERBB4 desempenha papel central na sobrevivência, plasticidade e função sináptica neuronal, sendo expressos em neurônios dopaminérgicos, cerebelares e em células gliais. Em doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer ou trauma cerebral, o ERBB4 é frequentemente superexpresso nas regiões afetadas, o que indica seu papel de neuroproteção.

O GRB2 é um gene que codifica uma proteína adaptadora essencial para a sinalização celular, principalmente na via Ras-MAPK. Possui importante atuação para função neural, porém em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Huntington possui ação neurotóxica. Na Alzheimer o GRB2 perde sua distribuição dendrítica e se acumula no corpo celular, onde interage com a APP (proteína precursora amiloide), essa interação promove a hiperativação da via MAPK/ERK, promovendo fosforilação patológica da tau, disfunção sináptica e apoptose neuronal. Na doença de Huntington também se encontra superexpresso, o que leva ao estresse celular (Majumder *et al.*, 2017).

A PTPN11, gene que codifica a fosfatase SHP2, tem papel essencial na regulação da comunicação entre neurônios. Em condições normais, ela controla o tráfego de receptores pós-sinápticos de glutamato e o funcionamento das vesículas sinápticas. Em neurônios que expressam variantes da PTPN11, esse processo é interrompido, o que pode contribuir para comprometimentos cognitivos na síndrome de Noonan (Guhathakurta *et al.*, 2024).

A PIK3R1 é uma molécula conservada que tem como funções a proliferação, diferenciação e apoptose. Responsável por regular a via PI3K/AKT, essencial para o desenvolvimento, função e sobrevivência neuronal e glial. Em um estudo realizado por Calco *et al.* (2025), demonstrou-se que mutações nesse gene têm sido associadas a atrasos no desenvolvimento, convulsões e microcefalia, além de quadros de neurodegeneração progressiva, como observado em um paciente com imunodeficiência comum variável que desenvolveu Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

A SRC é uma tirosina cinase não receptora, presente e expressa em todos os tipos de células. SRC é mediadora central em várias vias de sinalização além de controlar a transdução de sinal relacionada à resposta inflamatória aguda. No sistema nervoso, a ativação da SRC é suficiente para induzir microgliose. Já a inibição da SRC pode reduzir a resposta inflamatória, promovendo neuroproteção (Yang et al., 2020).

Em estudo realizado por Weeks e colaboradores (2022), observou-se que a inibição farmacológica do proteassoma ou a deleção genética de PSMB1 em peixes-zebra levou ao acúmulo de proteínas ubiquitinadas, apoptose neuronal excessiva,

atraso de crescimento e malformações craniofaciais e de órgãos internos, evidenciando o importante papel do PSMB1 na sobrevivência neural.

O PSMB9, que codifica a subunidade β1i do imunoproteassoma, desempenha papel importante na degradação protéica em condições de estresse oxidativo e inflamação, podendo estar relacionado com processos neurodegenerativos. Polimorfismos de nucleotídeos no PSMB9 foram associados ao aumento da atividade proteassoma no Alzheimer, o que contribui para vulnerabilidade neural (Sun *et al.*, 2019).

Em conjunto, os dados obtidos apontam que os principais alvos moleculares identificados estão envolvidos na manutenção da homeostase neural, como os processos de sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica, formação e manutenção da mielina, regulação da neuroinflamação e degradação proteica. Alterações nessas proteínas e vias de sinalização podem levar a processos neurodegenerativos, como na Doença de Alzheimer e de Parkinson, bem como em condições de estresse oxidativo e apoptose neuronal.

5.2. Análises das vias *Reactome* e *GO*

5.2.1. Análise das vias *Reactome*

Reactome é um banco de dados de vias de sinalização e processos humanos. Os componentes contemplados incluem ácidos nucleicos, pequenas moléculas, proteínas e complexos de macromoléculas, que possibilitam a representação clara, de processos como sinalização, metabolismo, regulação, apoptose e transmissão sináptica (Croft *et al*., 2010). O *Reactome* até o ano de 2023 possuía cerca de 11.148 entradas e genes envolvidos em 14.803 reações. Além de um grande número de anotações de doenças genéticas, incluindo cerca de 4.919 proteínas variantes derivadas de 354 produtos de genes humanos (Milacic *et al*., 2023).

Desse modo, o enriquecimento da topologia resultou em 421 vias de *Reactome*. Dessas, selecionou-se 30 baseadas no FDR-valor, tendo maior destaque a via de transdução de sinal e via de transdução por receptor nuclear (Figura 5). A via

de transdução de sinal, corresponde ao conjunto de processos biológicos que permitem que uma célula receba um estímulo e produza uma resposta específica. Um exemplo de via de transdução de sinal, são os receptores de tirosina cinase como EGFR, ERBB2 e ERBB4. Os fatores de crescimento epidermal foram identificados como protoncogene e estão associados a um grande número de casos de tumores (Silva *et al*., 2009). Além de suas atividades no sistema nervoso envolvendo neurodegeneração, mielinização, proteção neural, atua em doenças neurodegenerativas como já discutido anteriormente (Liao *et al.,* 2018; Mansour *et al.*, 2024) .

As vias de sinalização por receptores nucleares são mediadas por sinais lipossolúveis, que atravessam a membrana. São regulados por hormônios esteroides, como estrogênio e progesterona, além de diversos outros sinais lipossolúveis como ácido retinóico e hormônios da tireoide (Sever e Glass, 2013).

Outras vias associadas a neurotoxicidade que se destacaram foram a via de transdução genética, doenças de transdução de sinal por receptores de fatores de crescimento e segundo mensageiro, expressão gênica, sinalização por tirosina cinase e outros. A União Europeia classifica o 2,4-DCP como uma substância desreguladora endócrina, o que evidencia a sua capacidade de interferir em várias vias metabólicas (Coelho et al., 2018).

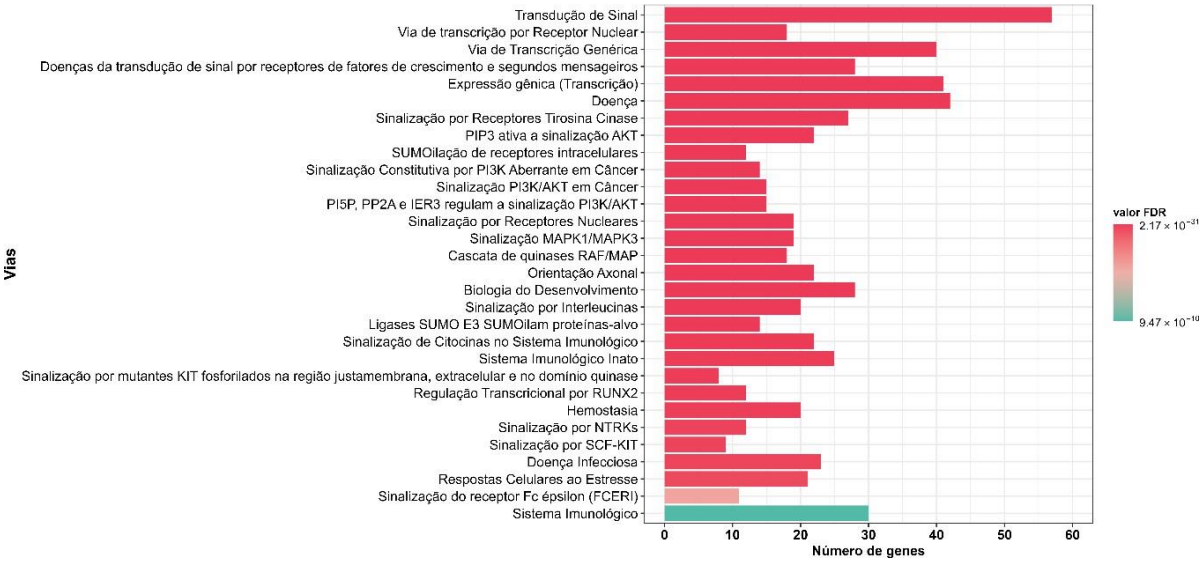

Figura 5. Análise das vias *Reactome* associadas aos alvos do 2,4-DCP relacionados à neurotoxicidade. O gráfico apresenta as 30 principais vias enriquecidas, classificadas de acordo com o valor de FDR-valor. O tamanho das barras representa

o número de genes associados a cada via. As cores indicam o valor de FDR, os tons rosas correspondem a valores de FDR mais baixos (maior significância estatística) e os tons azuis os valores de FDR mais altos (menor significância estatística).

5.2.2. Análise das vias do GO

A Ontologia Genética (GO) é um sistema padronizado que organiza informações sobre genes e seus produtos em três dimensões principais: função molecular, processo biológico e componente celular (Thomas, 2019).

Foram identificadas um total de 1.190 vias de GO, distribuídas em 983 associadas a processos biológicos (PB), 132 a função molecular (FM) e 73 a componentes celulares. Para cada uma dessas, foram selecionadas as 30 principais vias baseadas no FDR-valor. Em processos biológicos, as principais vias foram a resposta celular à substância orgânica e a resposta ao estímulo endógeno (Figura 6). As células podem responder a substâncias orgânicas de diferentes maneiras, seja com o objetivo de obter energia ou em forma de lesão celular. Um exemplo são as vias relacionadas ao estresse oxidativo, que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO's, e a capacidade de defesa antioxidante da célula, muito comum em situações de exposição a xenobióticos (Barbosa et al., 2010).

As respostas a estímulos endógenos se referem aos processos celulares ativados por sinais originados dentro do organismo, um exemplo são as sinalizações de fator de crescimento como o EGFR. O EGFR tem atuação importante nos mecanismos relacionados à neurotoxicidade, uma vez que alterações nesse receptor podem levar a neurodegeneração (Romano e Bucci, 2020).

Na categoria de função molecular, a via que apareceu em destaque foi a de atividade de receptores nucleares, semelhante ao que foi observado nas vias de *Reactome*. Isso indica que os alvos do 2,4-DCP podem atuar diretamente em receptores intracelulares, como hormônios esteróides e ácidos retinoicos. Segundo Sharma *et al.* (2022), os receptores retinoides atuam como fatores de transcrição e modulam genes essenciais para funções neuronais. A sinalização anormal desses receptores está associada ao estresse neuronal e a neuroinflamação em condições patológicas.

Por último, em componente celular, as vias de sinalização que se destacaram foram as que atuam no lúmen de organelas intracelulares, indicando que muitos alvos analisados atuam no interior das células. Dentro dessa categoria o núcleo aparece de forma recorrente, o que corroboram com os resultados anteriores, uma vez que foi observado atividade nucleares nas análises de *reactome* e função molecular.

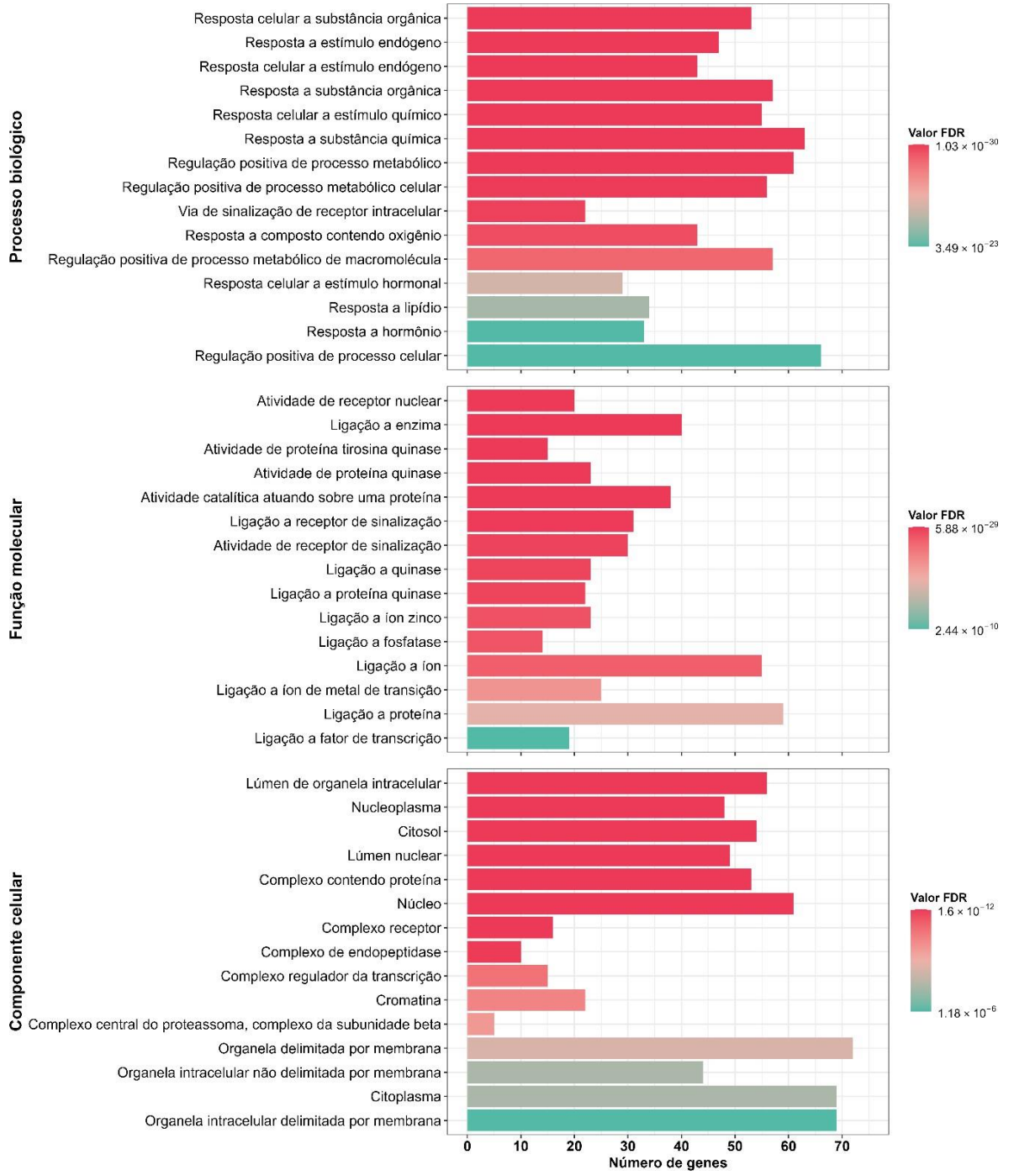

Figura 6. Análise das vias de GO associadas aos alvos do 2,4-DCP relacionados à neurotoxicidade. As 30 principais vias das categorias de Processos Biológicos, Função Molecular e Componente Celular. Baseado no FDR-valor. O tamanho das barras representa o número de genes associados a cada via. As cores indicam o valor de FDR, os tons rosas correspondem a valores de FDR mais baixos (maior significância estatística) e os tons azuis os valores de FDR mais altos (menor significância estatística).

5.3. *Docking* molecular

Os ensaios de *docking* molecular foram realizados entre o 2,4-DCP e os 7 principais genes que apresentaram maior grau de MMC e seus respectivos controles positivos, com o objetivo de comparar as possíveis interações e suas energias. Para a realização do *docking* molecular foi usado o programa Autodock Vina. Nesse programa, quanto mais negativa for a energia resultante, mais forte é a interação.

Os ensaios de *docking* molecular revelaram que o 2,4-DCP apresentou valores de afinidade que variam de -3,6 e -5,7 kcal/mol em relação às proteínas testadas (Figura 7). O alvo mais favorável foi a proteína ERBB2 (-4,6 kcal/mol), seguido por GRB2 (-4,5 kcal/mol). Em comparação, os ligantes apresentaram energias de ligação mais negativas, principalmente GRB2 (-6,9 kcal/mol) e ERBB2 (-5,4 kcal/mol), o que mostra maior estabilidade nas ligações entre as proteínas e seus ligantes. As energias de interações são consideradas favoráveis comparando com outros trabalhos *in silico* (Wang *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2023).

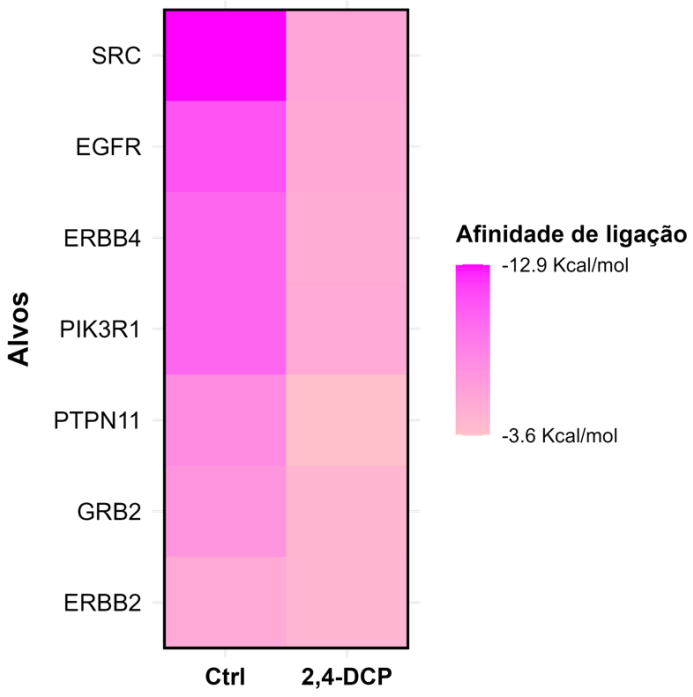

Figura 7. Mapa de calor do *docking* molecular do 2,4-DCP com os alvos associados a neurotoxicidade e seus controles (Ctrl), obtidos a partir da análise da rede PPI. O

eixo X representa os controles e o 2,4-DCP e o eixo Y os alvos moleculares. A escala de cor representa a energia de ligação de cada ligação.

As interações entre o 2,4-DCP e os 7 principais alvos, são mostrados na Figura 8. A análise do *docking* molecular mostrou que o 2,4-DCP interage com resíduos de aminoácidos críticos do sítio ativo do EFGR como Met766, Leu77, Phe856, essas ligações também são compartilhadas pelo ligante original. Já em relação a interação do 2,4-DCP com o ERBB2, possui Leu1291, Leu1354, Val1351 e Ile1295 em comum com o ligante original, resíduos predominantemente hidrofóbicos. De forma semelhante, no ERBB4, ambos os ligantes interagem com resíduos de aminoácidos que em sua maioria são hidrofóbicos. Os resíduos em comum de interação entre o 2,4-DCP e o ligante são Met747, Phe837 e Lys726, destes apenas Lys possui caráter polar. No caso do GRB2, observou-se que o composto 2,4-DCP interagiu com Trp121 e Ser139, enquanto o ligante original interagiu com Arg67, His107, Arg142 e Lys109. Não foram encontradas interações em resíduos de aminoácidos em comum, isso pode ser justificado pelo tamanho pequeno da molécula de 2,4-DCP. No receptor PIK3R1, tanto o 2,4-DCP quanto o ligante original apresentam interações em comum com Trp1780, Ile1932 e Val1851. Já no caso do PTPN11 apresentou apenas uma interação em comum, Arg478.

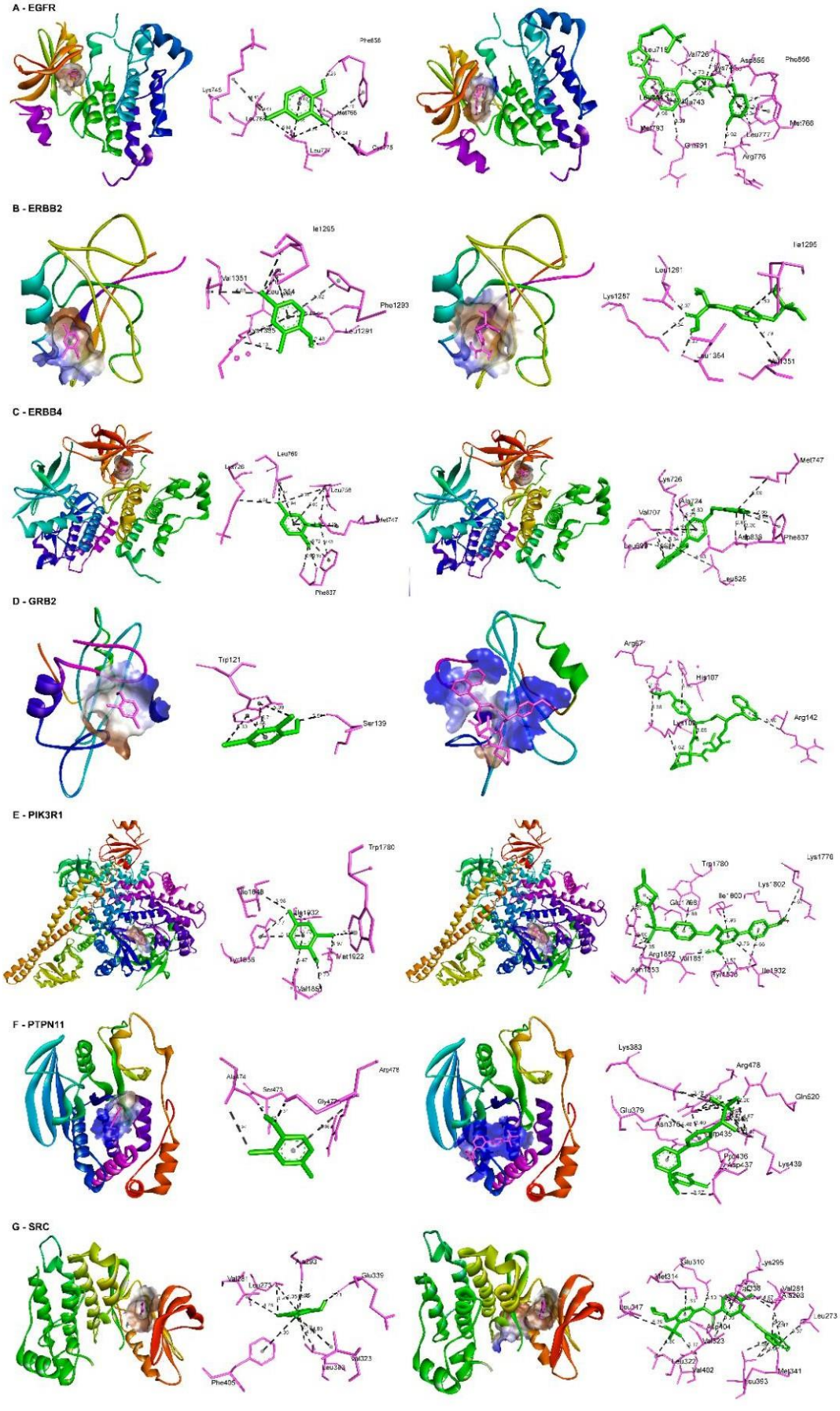
A - EGFR
B - ERBB2
C - ERBB4
D - GRB2
E - PIK3R1
F - PTPN11
G - SRC
Hidrofobicidade
3,00
2,00
1,00
0,00
-1,00
-2,00
-3,00

Figura 8. *Docking* molecular do 2,4-DCP com as macromoléculas EGFR (A); ERBB2 (B); ERBB4 (C); GRB2 (D); PIK3R1 (E); PTPN11 (F); SRC (G). As imagens à esquerda representam as interações entre o 2,4-DCP (em verde) e resíduos de aminoácidos da macromolécula de interesse (em rosa), enquanto as imagens à direita representam a interação entre a macromoléculas e seus ligantes originais.

5.5. Biomarcadores enzimáticos

Foram analisados os cérebros de peixes expostos a duas concentrações de 2,4-DCP (30 e 300 ug/L) por 21 dias e daqueles mantidos em água livre de cloro (grupo controle), quanto à atividade enzimática de biomarcadores de toxicidade. A atividade da GST apresentou variação significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p<0,05$) (Figura 9). A exposição de 30 µg/L resultou em redução da atividade enzimática (7,847 ± 2,787 µmol/min./mg proteína), enquanto a concentração de 300 µg/L (8,742 ± 4,120 µmol/min./mg proteína) não apresentou diferença significativa em relação ao controle (10,72 ± 2,138 µmol/min./mg proteína). Esse padrão pode ser explicado pela compensação metabólica, que ocorre quando um organismo exposto a uma maior exposição de xenóbioticos, pode ativar mecanismo compensatórios como a indução de isoformas da GST ou aumento da síntese de glutationa, permitindo que a atividade enzimática se mantenha próxima do controle. A GST atua no metabolismo de aminoácidos, sendo responsável pela isomerização do ácido 13-*cis*-retinóico ao ácido 13-*trans*-retinóico, além de desempenhar papel importante no estresse oxidativo e na proteção contra xenobióticos, por meio da conjugação de glutationa a compostos potencialmente tóxicos (Huber *et al*., 2008). Quando sua atividade diminui, ocorre um maior acúmulo de compostos tóxicos e radicais livres, levando ao aumento do estresse oxidativo, podendo levar a dano neuronal, comprometendo funções cognitivas e a integridade das células do sistema nervoso.

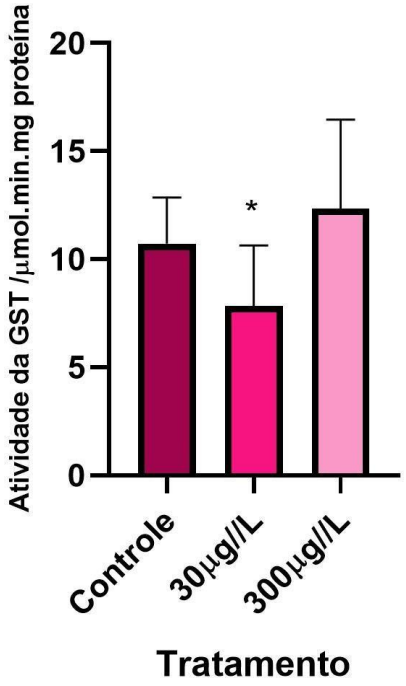

Figura 9. Atividade da enzima GST em cérebros de peixes expostos a duas concentrações de ao 2,4-DCP (30 e 300 ug/L), por 21 dias, em comparação com peixes mantidos somente em água livre de cloro (Controle). *p < 0,05 quando comparado ao controle.

A atividade da GPx (Figura 10) não apresentou diferenças significativas entre o grupo controle e os tratamentos (Kruskal-Wallis, p < 0,05. Em contrapartida, Tsukazawa *et al*. (2022) relataram que em larvas de peixe-zebra a exposição a 2,4-DCP reduziu a expressão de mRNA de GPx. Essas diferenças podem ter associação com o estágio de vida, ao nível biológico analisado, e ao tecido.

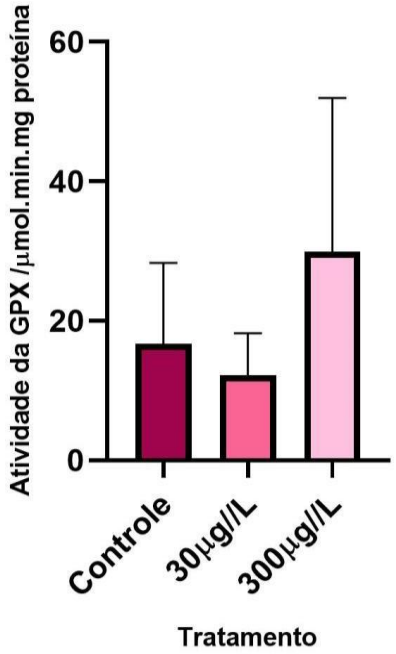

Figura 10. Atividade da enzima GPX em cérebros de peixes expostos a duas concentrações de ao 2,4-DCP (30 e 300 ug/L), por 21 dias, em comparação com peixes mantidos somente em água livre de cloro (Controle). $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis) quando comparado ao controle.

O ensaio do biomarcador LDH (Figura 11) mostrou diferença significativa ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis) entre o controle (417,6 ± 182,7 µmol/min./mg proteína) e o tratamento 30 µg/L (295,8 ± 130,2 µmol/min./mg proteína). Já em 300 µg/L (379,3 ± 155,3 µmol/min./mg proteína) não foi detectada diferença significativa, o que pode estar associado a um processo de compensação metabólica semelhante ao observado para a GST. A LDH está presente em todos os tecidos do corpo envolvida na conversão de lactato em piruvato, e atua como marcador inespecífico de renovação tecidual e estresse celular (Farhana e Lappin, 2023). Alterações na atividade da LDH podem refletir dano celular ou metabólico.

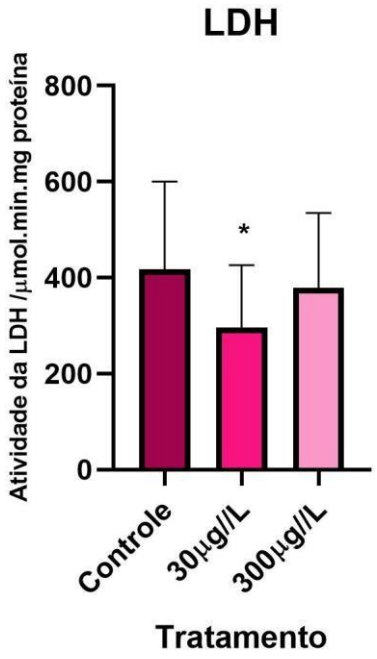

Figura 11. Atividade da enzima LDH em cérebros de peixes expostos a duas concentrações de ao 2,4-DCP (30 e 300 ug/L), por 21 dias, em comparação com peixes mantidos somente em água livre de cloro (Controle). *p < 0,05 (Kruskal-Wallis) quando comparado ao controle.

No ensaio do biomarcador AChE (Figura 12), observou-se uma redução significativa da atividade enzimática no tratamento com 30 µg/L (68,66 ± 13,43 µmol/min./mg proteína) em comparação com o controle (104,2 ± 19,23 µmol/min./mg proteína), segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (p<0,05). No tratamento com 300 µg/L (166,3 ± 168,8 µmol/min./mg proteína), não foi observado redução significativa, possivelmente devido a uma alta variação entre as réplicas ou pela ocorrência de mecanismos de compensação metabólica semelhantes aos discutidos para a GST e LDH. A AChE desempenha papel importante na manutenção da neurotransmissão, alterações na sua atividade podem estar associadas a perda neural e progressão de doenças neurodegenerativas (Behl *et al.,* 2023). Desse modo, a redução dos níveis de AChE pode ser um importante indicativo de neurotoxicidade.

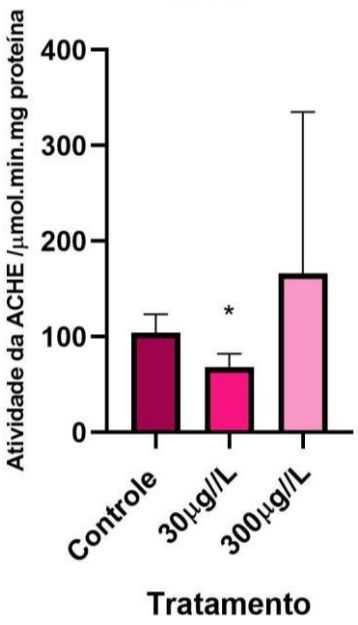

Figura 12. Atividade da enzima AChE em cérebros de peixes expostos a duas concentrações de ao 2,4-DCP (30 e 300 ug/L), por 21 dias, em comparação com peixes mantidos somente em água livre de cloro (Controle). *p < 0,05 (Kruskal-Wallis) quando comparado ao controle.

Os resultados *in silico* obtidos pela análise da rede IPP e enriquecimento de vias apontaram para a participação de alvos moleculares relacionados com processos de neurodesenvolvimento, plasticidade sináptica, manutenção da mielina, sinalização celular e regulação da neuroinflamação. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados nos ensaios *in vivo,* nos quais foram observadas alterações significativas nos biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo (GST), dano celular (LDH) e neurotoxicidade (AChE). A inibição da AChE, na menor concentração (30 µg/L), sugere comprometimento da neurotransmissão colinérgica, o que pode levar a um maior desequilíbrio na função sináptica possivelmente relacionado à modulação de vias de sinalização apontadas pelas análises de *Reactome* (EGFR, ERBB2, ERBB4).

6. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, conclui-se a análise da rede IPP e o enriquecimento de vias apontaram como principais alvos proteínas relacionadas a neurodesenvolvimento, manutenção da mielina, regulação da neuroinflamação e plasticidade sináptica, destacando-se EGFR, ERBB2, ERBB4, GRB2, PIK3R1 e SRC. Além disso, identificamos receptores nucleares como alvos relevantes, associados à sinalização de ácido retinóico, sugerindo potencial interferência em processos para o desenvolvimento neural.

Os resultados enzimáticos reforçam essa relação, mostrando inibição de biomarcadores (GST e AChE) em concentrações ambientalmente relevantes, corroborando os relatos da literatura que associam o 2,4-DCP a estresse oxidativo, neurotoxicidade e alterações no desenvolvimento. A inibição da GST indica estresse oxidativo, coerente com a ativação de vias de resposta celular à substância orgânica detectadas nas análises de enriquecimento de vias. Já a inibição da AChE em 30 µg/L, sugere comprometimento da neurotransmissão colinérgica, o que pode contribuir para prejuízos cognitivos e comportamentais, vistos em literatura.

Ainda há escassez de informações na literatura sobre os efeitos moleculares e neurotóxicos do 2,4-DCP, especialmente em exposições crônicas e baixas concentrações. Essa lacuna é preocupante, uma vez que o Brasil carece de regulamentação específica para níveis seguros dessa substância no ambiente. Em outras regiões como a União Europeia já possuem limites mais restritivos e protocolos de monitoramento mais avançados. Assim, os resultados destacam a necessidade de novos estudos que explorem diferentes estágios de desenvolvimento e análises comportamentais.

Referências

AGARWAL, S.; MEHROTRA, R. **Mini Review_ An overview of Molecular Docking**, 2016.

ALVES, J. et al. Network Toxicology and Molecular Docking to Investigate the Non-AChE Mechanisms of Organophosphate-Induced Neurodevelopmental Toxicity. **Toxics**, v. 11, n. 8, p. 710–710, 17 ago. 2023.

AMANY EL-SIKAILY; SOHA SHABAKA. Biomarkers in aquatic systems: Advancements, applications and future directions. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 50, n. 2, p. 169–182, 31 maio 2024.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 29 jan. 1976.

CALCO, B. et al. **A novel frameshift mutation in Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1) causes immunodeficiency and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)**. Disponível em: <A novel frameshift mutation in Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1) causes immunodeficiency and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)>. Acesso em: 15 ago. 2025.

CAMILOTTI, A. Efeitos do uso de inseticidas e óleos essenciais no controle de mosquitos na saúde humana e ambiente : uma revisão de literatura. **Ufrgs.br**, jul. 2022.

CAMPOS, A. L. DE et al. O avanço do agrotóxico no Brasil e seus impactos na saúde e no ambiente. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 1, p. e007934, 31 jan. 2021.

CANEDO, A. et al. O peixe-zebra (Danio rerio) encontra a bioética: os princípios éticos dos 10Rs na pesquisa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, 30 mar. 2022.

CHAHARDEHI, A.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. **Plants**, v. 9, n. 10, 2020.

CHAKRABORTY, C. et al. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, 20 ago. 2016

CHOI, H.-J. et al. EGFR is a potential dual molecular target for cancer and Alzheimer's disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2 ago. 2023.

CLAIBORNE, A. **Claiborne, A. (1985) Catalase activity. In Greenwald, R.A., Ed., CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, CRC Press, Boca Raton, 283-284. - References - Scientific Research Publishing**. Disponível em: <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers?ReferenceID=796054>.

COELHO, E. R. C. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de 2,4-D, 2,4-DCP e 2,4,5-T para monitoramento em água de abastecimento público. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 6, p. 1043–1051, dez. 2018.

CROFT, D. et al. Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Database issue, p. D691–D697, 1 jan. 2011.

CROUZIER, L. et al. Use of Zebrafish Models to Boost Research in Rare Genetic Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13356, 12 dez. 2021.

DANIELA, S. **Caracterização biofísica da proteína Grb2 e primeiras comparações após sua liofilização**. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/entities/publication/351ead56-1cca-478d-bc98-5f7238361fce>. Acesso em: 8 set. 2025.

DOMINGUES, I. et al. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 338–345, 1 set. 2010.

FARHANA, A.; LAPPIN, S. L. **Biochemistry, Lactate Dehydrogenase (LDH)**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/>.

FERNANDEZ, M. et al. Effectiveness of a simple biomixture for the adsorption and elimination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide and its metabolite, 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), for a biobed system. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 10, n. 1, p. 106877–106877, 1 fev. 2022.

FU, J. et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in 2,4-dichlorophenol-induced hepatotoxicity. **The Journal of toxicological sciences**, v. 41, n. 6, p. 745–756, 2016.

GAAIED, S. et al. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 4, p. 3686–3696, 18 fev. 2019.

GOMES, C. et al. AGROTÓXICOS E A SAÚDE HUMANA: uma revisão bibliográfica. **Revista Higei@ - Revista Científica de Saúde**, v. 3, n. 6, 2021

GUHATHAKURTA, D. et al. Rasopathy-Associated Mutation Ptpn11^{D61Y} has Age- Dependent Effect on Synaptic Vesicle Recycling. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 44, n. 1, p. 77, Spring 202

HUANG, D. et al. 2,4- Dichlorophenol induces DNA damage through ROS accumulation and GSH depletion in goldfish *Carassius auratus*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 59, n. 9, p. 798–804, 9 ago. 2018.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. DE. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

JU, Z. et al. Combined Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Its Metabolites 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP) on Two Nontarget Organisms. **ACS Omega**, v. 4, n. 1, p. 1669–1677, 18 jan. 2019.

LIAO, D. et al. Dysregulation of Neuregulin-1/ErbB signaling in the hippocampus of rats after administration of doxorubicin. **Drug Design Development and Therapy**, v. Volume 12, p. 231–239, 1 jan. 2018.

LIONETTO, M. G. et al. Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, jun. 2018.

MA, Y. et al. Disruption of endocrine function in in vitro H295R cell-based and in in vivo assay in zebrafish by 2,4-dichlorophenol. **Aquatic Toxicology**, v. 106-107, p. 173-181, 1 jan. 2012.

MAJUMDER, P. et al. Cellular levels of Grb2 and cytoskeleton stability are correlated in a neurodegenerative scenario. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 5, p. 655-669, 1 maio 2017.

MANSOUR, H. M. et al. Unveiling the therapeutic prospects of EGFR inhibition in rotenone-mediated parkinsonism in rats: Modulation of dopamine D3 receptor. **Brain Research**, v. 1834, p. 148893, 28 mar. 2024.

MARTINS, R. X. et al. Biochemical Markers for Liver Injury in Zebrafish Larvae.

Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 2753, p. 469–482, 30 jan. 2024.

MARTINS, R. X. et al. A network toxicology and molecular docking-based approach revealed shared hepatotoxic mechanisms and targets between the herbicide 2,4-D and its metabolite 2,4-DCP. **Toxicology**, p. 154086–154086, 1 fev. 2025

MILL, C. P. et al. ErbB2 Is Necessary for ErbB4 Ligands to Stimulate Oncogenic Activities in Models of Human Breast Cancer. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 8, p. 792– 804, 1 ago. 2011.

PANKRATOVA, S. et al. The S100A4 Protein Signals through the ErbB4 Receptor to Promote Neuronal Survival. **Theranostics**, v. 8, n. 14, p. 3977–3990, 2018.

PANKRATOVA, S. et al. The S100A4 Protein Signals through the ErbB4 Receptor to Promote Neuronal Survival. **Theranostics**, v. 8, n. 14, p. 3977–3990, 2018.

PEI, J. et al. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2 mar. 2023.

RIBEIRO, O. M. R. et al. O peixe-zebra (Danio rerio) como modelo emergente na ecotoxicologia. **Revista de Ciência Elementar**, v. 10, n. 2, 30 jun. 2022.

ROMANO, R.; BUCCI, C. Role of EGFR in the Nervous System. **Cells**, v. 9, n. 8, 12 ago. 2020.

SACHU, M.; KYNSHI, B. L.; SYIEM, M. B. Cyanobacterial degradation of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): Its response to the oxidative stress induced by the primary degradation product 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 273, p. 109739, nov. 2023.

SALOMÃO, P.; FERRO, A.; RUAS, W. **View of Herbicides in Brazil: a brief review**. Disponível em: <https://rsdjournal.org/rsd/article/view/1990/1653>. Acesso em: 19 jul. 2025.

SEVER, R.; GLASS, C. K. Signaling by Nuclear Receptors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 3, p. a016709–a016709, 1 mar. 2013.

SHARMA, S. et al. Retinoid X Receptor: Cellular and Biochemical Roles of Nuclear Receptor with a Focus on Neuropathological Involvement. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 4, p. 2027–2050, 11 jan. 2022.

SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009.

SILVA, Davi Junior Santos. **Os Impactos do Agrotóxico por uma Perspectiva de Saúde Pública**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz de Mato Grosso do Sul. 2022.

SUN, C. et al. Activation of the immunoproteasome protects SH-SY5Y cells from the toxicity of rotenone. **Neurotoxicology**, v. 73, p. 112–119, 1 jul. 2019.

THOMAS, P. D. The Gene Ontology and the Meaning of Biological Function. **Methods in Molecular Biology**, v. 1446, p. 15–24, 4 nov. 2016.

TSUKAZAWA, K. S.; LI, L.; TSE, W. K. F. 2,4-dichlorophenol exposure induces lipid accumulation and reactive oxygen species formation in zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 230, p. 113133, jan. 2022.

UEDA, R. M. R. et al. Neurotoxicity associated with chronic exposure to dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) – a simulation of environmental exposure in adult rats. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 56, n. 8, p. 695–705, 14 jun. 2021.

WANG, Y. et al. Engineering substrate promiscuity in 2,4-dichlorophenol hydroxylase by*in silico*design. **RSC Advances**, v. 8, n. 38, p. 21184–21190, 1 jan. 2018.

WEEKS, O. et al. Embryonic alcohol exposure disrupts the ubiquitin-proteasome system. **JCI Insight**, v. 7, n. 23, 8 dez. 2022.

XI, Y.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. Adsorption of the herbicide 2,4-D on organo-palygorskite. **Applied Clay Science**, v. 49, n. 3, p. 255–261, jul. 2010.

XI, Y.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. Adsorption of the herbicide 2,4-D on organo-palygorskite. Applied Clay Science, v. 49, n. 3, p. 255–261, jul. 2010.

YANG, H. et al. Src Inhibition Attenuates Neuroinflammation and Protects Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease Models. Frontiers in Neuroscience,

v. 14, 18 fev. 2020.

ZHANG, X. et al. Development and Application of Network Toxicology in Safety Research of Chinese Materia Medica. Chinese Herbal Medicines, v. 7, n. 1, p. 27– 38, fev. 2015.

ZHU, M. et al. MFC based in situ electrocatalytic persulfate activation for degradation of 2,4-dichlorophenol: Process and mechanism. Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 10, n. 6, p. 108803, dez. 2022

.