



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Luiz Otávio de Barros Vilas Bôas

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA ISOFORMA
GLUTATIONA S-TRANSFERASE ÔMEGA 2.1, RECOMBINANTE, DE
OSTRA *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793)**

Florianópolis
2022

Luiz Otávio de Barros Vilas Bôas

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA ISOFORMA
GLUTATIONA S-TRANSFERASE ÔMEGA 2.1, RECOMBINANTE, DE
OSTRA *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793)**

Dissertação submetida ao Programa de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.

Coorientador: Prof. Guilherme Razzera Maciel, Dr.

Florianópolis
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vilas Bôas, Luiz Otávio de Barros
Caracterização estrutural e funcional da isoforma
Glutathione S-Transferase Ômega 2.1, recombinante, de ostra
Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) / Luiz Otávio de Barros
Vilas Bôas ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy,
coorientador, Guilherme Razzera, 2022.
64 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Glutathione S-Transferase. 3.
Glutathione. 4. Isoforma Ômega. I. Bainy, Afonso Celso Dias.
II. Razzera, Guilherme. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Luiz Otávio de Barros Vilas Bôas

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA
ISOFORMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE ÔMEGA 2.1,
RECOMBINANTE, DE OSTRA *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793)**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Maria Risoleta Freire Marques, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Patrícia Hermes Stoco, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à minha família e aos meus amigos e professores do LABCAI.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe, pois sem ela, nem seria possível estar em Florianópolis para realizar meus estudos, seja graduação ou pós-graduação. Que se mostra extremamente solícita e compreensiva, seja qual for o momento, e não mede esforços para que eu me sinta acolhido e amparado, mesmo que a distância.

Ao meu orientador Afonso Bainy e coorientador Guilherme Razzera, agradeço muito por toda a confiança depositada, disposição a ajudar e compreensão. Sempre me motivando a continuar e a acreditar na minha capacidade.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho Vanessa Schadeck e Flávia Zacchi. Vanessa merece metade do meu diploma, praticamente me pegou pela mão e me ajudou a concluir o mestrado. Flávia é uma segunda coorientadora, que dá todo o reforço positivo que precisamos, e está sempre por perto, nos ajudando e motivando.

À Karin dos Santos e Tâmela Madaloz por todo o suporte concedido e pela paciência. Ótimas professoras de bioinformática.

Ao Jacó, que é um querido, extremamente solícito, que em muitos aspectos faz o LABCAI ser o LABCAI.

A todos os amigos do LABCAI, que também não medem esforços para ajudar, e são muito companheiros em todos os momentos, e que eu espero poder logo menos aglomerar de novo e dar muita risada tomando litros de café.

A UFSC que é uma instituição maravilhosa, que acolhe, ensina, resiste, “milita” e faz tudo o que uma instituição de alto nível deve fazer.

A CAPES por disponibilizar a minha bolsa de estudos, sem a qual também não seria possível me manter em Florianópolis, e ao CNPq e a Petrobras por financiarem muito da pesquisa do LABCAI, mesmo que às vezes de forma indireta.

RESUMO

Ferramentas de biomonitoramento ambiental, como os biomarcadores, são necessárias para a identificação, avaliação e remediação do impacto antrópico em ambientes aquáticos. Enzimas dos sistemas de biotransformação de fase II, como as Glutathione *S*-transferases (GST), estão entre os biomarcadores clássicos. *Crassostrea gigas* é a ostra mais cultivada do mundo e devido às suas características como organismo filtrante, sésil de ampla distribuição geográfica, tem sido frequentemente utilizada em estudos com biomarcadores. Mesmo que as GST sejam enzimas comumente estudadas em diversas espécies, pouco se sabe sobre esta família de proteínas em *C. gigas*. Em virtude de significativas mudanças na transcrição de genes e de atividade enzimática de GSTs da classe ômega, em ostras de aquicultura e ambientes naturais, ou expostas a hidrocarbonetos, diferentes salinidades e pH, em condições laboratoriais, o presente estudo teve como objetivo caracterizar estrutural e funcionalmente a GST Ômega 2.1 da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (CgGSTO2.1), número de acesso XP_011429380.2 (NCBI). Um modelo tridimensional *in silico* dimérico foi construído para esta sequência. As análises de *docking* molecular geraram estimativas da afinidade por ligantes (ΔG) com os substratos Glutathione (GSH), Glutathione S-(2,4 dinitrobenzeno) (GDN) e Dehidroascorbato (DHA). Os valores de ΔG sugerem maiores interações para GSH e GDN com GST ômega de *C. gigas* por meio dos resíduos Cisteína 28 (Cis28) e Lisina 55 (Lis55). Além disso, a proteína recombinante foi expressada, purificada, e uma fração foi obtida para testes de atividade. Os testes com CDNB demonstraram taxa de absorvância diferente do branco, sugerindo atividade GST, diferente da DHA, que demonstrou taxa de absorvância semelhante ao controle negativo. Novos ensaios *in vitro* com novas condições devem ser realizados, uma vez que as análises *in silico* sugerem a utilização de ambos substratos pela CgGSTO2.1.

Palavras-chave: Glutathione *S*-transferase, Glutathione, Isoforma, Ômega, *Crassostrea gigas*

ABSTRACT

Environmental biomonitoring tools, such as biomarkers, are necessary for the identification, assessment and remediation of human impact in aquatic environments. Enzymes of phase II biotransformation systems, such as Glutathione *S*-transferases (GST), are among the classic biomarkers. *Crassostrea gigas* is the most cultivated oyster in the world and due to its characteristics as a filtering, sessile organism and wide geographic distribution, it has been frequently used in studies with biomarkers. Even though GSTs are enzymes commonly analyzed in several species, little is known about this family in *C. gigas*. Due to significant changes in gene transcription and enzymatic activity of omega class GSTs, in oysters from aquaculture and natural environments, or exposed to hydrocarbons, different salinities and pH, under laboratory conditions, the present study aimed to characterize structurally and functionally the Omega 2.1 GST of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgGSTO2.1), accession number XP_011429380.2 (NCBI). A three-dimensional dimeric *in silico* model was constructed from this sequence. Molecular docking analyzes generated estimates of ligand affinity (ΔG) with the substrates Glutathione (GSH), Glutathione *S*-(2,4 dinitrobenzene) (GDN) and Dehydroascorbate (DHA). The ΔG values suggest greater interactions for GSH and GDN with GST omega from *C. gigas* through residues Cys28 and Lys55. In addition, the recombinant protein was expressed, purified, and a fraction was obtained for activity tests. Tests with CDNB showed an absorbance rate different from the blank, suggesting GST activity. DHA showed a very low absorbance rate similar to the negative control. New *in vitro* assays with new conditions should be performed, since *in silico* analyzes suggest the use of both substrates by CgGSTO2.1.

Keywords: Glutathione *S*-transferase. Glutathione. Isoform. Omega. *Crassostrea gigas*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Recorte da visualização do alinhamento das sequências, regiões N-terminal (A) e C-terminal (B), no software JalView, selecionadas por identidade acima de 15%. *Bombyx mori*, *Crassostrea gigas*, *Homo sapiens* isoformas 1.1 e 2.1, *Oryza sativa japonica*, *Trametes versicolor* isoformas 1C, 2C e 3C e *Neisseria gonorrhoeae*. Quadros delimitam a região da sequência referentes aos motivos $\beta\alpha\beta$ (vermelho) e $\beta\beta\alpha$ (azul). Setas vermelha e azul indicam resíduos catalíticos em seus respectivos motivos. Seta verde indicando a posição da cisteína 165 em *C. gigas*. Resíduos com identidade preservada acima de 90% apresentam cores fortes variadas. 33

Figura 2 – Sobreposição de modelos monoméricos de GSTO (C-score = 1; TM-score = 0,956; RMSD = 0,74 Å) no UCSF Chimera, exemplificando o enovelamento canônico da superfamília. Em cinza, o modelo criado pela plataforma I-TASSER para CgGSTO2.1. Em azul claro, 1EEM, modelo de GSTO1.1 humana disponível no PDB e selecionado por maior identidade preservada entre sequências. 35

Figura 3 – Conteúdo de alfa-hélices e folhas beta-pregueadas do modelo monomérico criado para CgGSTO2.1 na plataforma I-TASSER. Regiões N e C-terminal coloridas em verde e cinza respectivamente. Alfa-hélices anotadas de 1 a 10 e folhas beta-pregueadas anotadas de 1 a 4. 36

Figura 4 – Monômero de CgGSTO2.1 construído na plataforma online I-TASSER. Em verde, resíduos pertencentes às alfa-hélices α_3 e α_4 , marcados como ativos e flexíveis para a dimerização na plataforma online HADDOCK. 37

Figura 5 – Comparação entre os dímeros de CgGSTO2.1 (HADDOCK, esquerda) e ômega de *Bombyx mori* PDB 3WD6 (direita) visualizados no UCSF Chimera. Em A, vista lateral do dímero, mostrando o contato entre monômeros. Em B, vista superior evidenciando o ponto de contato entre monômeros referente às alfa-hélices α_3 e α_4 38

Figura 6 – Gráfico de Z-score para estruturas resolvidas de forma experimental, depositadas em bancos de dados públicos, em comparação com o comprimento de suas cadeias polipeptídicas,

obtido na plataforma online ProSA Web. O ponto preto indica a localização do Z-score -7,64 conferido a estrutura do dímero de CgGSTO2.1..... 39

Figura 7 – Gráfico de Ramachandran (*Ramachandran plot server*) do dímero construído para CgGSTO2.1 por *docking* proteína-proteína. Regiões cinza escuro, cinza médio e cinza claro representam ângulos de torção altamente recomendados. Torções favoráveis e questionáveis são regiões brancas com quadriculado preto e quadriculado cinza, respectivamente. 93% dos ângulos de torção do dímero estão localizados em regiões altamente recomendadas (cruzes verdes), 5,8% localizados em regiões favoráveis (triângulos laranjas) e 1,2% em regiões questionáveis (pontos vermelhos). 40

Figura 8 – *Docking* molecular da CgGSTO2.1 com GSH . A esquerda, dímero e ligante com superfície semitransparente internalizado no bolsão de ligação. A direita, aproximação do bolsão de ligação com resíduos catalíticos demarcados. Em azul, a melhor pose do ligante GSH com energia livre de ligação estimada em -6,427 kcal/mol e RMSD 6,857 Å em relação à referência do modelo cristalográfico 1EEM (GSH rosa). Imagens geradas com programa UCSF Chimera 42

Figura 9 – Comparação entre as cavidades de ligação dos modelos GSTO1.1 humana, PDB 1EEM (esquerda) e CgGSTO2.1 (direita) com coloração de potencial Coulombiano. No interior, a molécula de GSH. 43

Figura 10 – *Docking* molecular da CgGSTO2.1 com GDN. A esquerda, dímero e ligante com superfície semi-transparente internalizado no bolsão de ligação. A direita, aproximação do bolsão de ligação com resíduos catalíticos demarcados. Em azul, a melhor pose do ligante GDN com energia livre de ligação estimada em -7,097 kcal/mol e RMSD 6,747 Å em relação à referência do modelo cristalográfico PDB 6F4F (GDN rosa). Imagens geradas com o programa UCSF Chimera. 44

Figura 11 – *Docking* molecular da CgGSTO2.1 com DHA. A esquerda, dímero e ligante com superfície semi-transparente internalizado no bolsão de ligação. A direita, aproximação do bolsão de ligação com resíduos catalíticos demarcados. Em azul, a melhor pose do ligante DHA com energia livre de ligação estimada em -6,696 kcal/mol e RMSD 6,708 Å em relação à

referência do modelo cristalográfico PDB 3VLN (DHA rosa). Imagens geradas com o programa UCSF Chimera.45

Figura 12 – Perfil proteico durante a expressão do gene CgGSTO2.1 com 1 mM final de IPTG em até 3h de incubação. Amostras coletadas a cada hora a partir do início da indução por IPTG (t0, t1, t2 e t3) flanqueadas por marcadores de peso molecular (M). Quadro vermelho indica a localização da proteína no gel segundo seu peso molecular (~30 kDa), aumentando a concentração em função do tempo. O perfil proteico foi visualizado em SDS-PAGE 12%....47

Figura 13 – Cromatograma de purificação da proteína rGSTO2.1 em FPLC por cromatografia de afinidade. Processo realizado com três injeções de amostra no sistema, tendo o pico de eluição da proteína (tracejado vermelho vertical) em concentração aproximada de 300 mM de imidazol (tracejado vermelho horizontal). Linhas preta e verde se referem à absorbância das proteínas presentes no tampão ao passar pela coluna *histrap* e concentração de imidazol no sistema de purificação, respectivamente.47

Figura 14 – SDS-PAGE de expressão e purificação da proteína rGSTO2.1. Nas extremidades, marcadores de peso molecular (M); tempos 0 e 3 horas de expressão (t0 e t3); sobrenadante (So) e precipitado (Pr) provenientes da lise e centrifugação; fração não ligante a coluna de *histrap* (NL) e frações referentes ao maior pico de absorbância da eluição (A1, A2 e A3). Quadro vermelho indica a migração da proteína recombinante no gel de acordo com o peso molecular.48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de identidade das sequências selecionadas em comparação com a isoforma ômega 2.1 de <i>Crassostrea gigas</i> (%). Comparações entre sequências completas e recortes das regiões dos motivos $\beta\alpha\beta$ e $\beta\beta\alpha$ alinhadas com as das espécies <i>Bombyx mori</i> (PDB-3WD6), <i>Homo sapiens</i> 1.1 (PDB-3VLN) e 2.2 (PDB-3Q18), <i>Oryza sativa japonica</i> (PDB-5D9V), <i>Trametes versicolor</i> 1C (PDB-6HJS), 2C (PDB-6SRA), 3C (PDB-6SRB) e <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (PDB-4HOJ) no programa MUSCLE.....	31
Tabela 2 – Resumo dos ensaios de <i>docking</i> molecular.	46
Tabela 3 – Valores obtidos para o teste de atividade com CDNB e DHA para volume fixo de proteína purificada rCgGSTO2.1 0,8 mg/ml.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° C – Graus Celcius

µl – Microlitro

µM – Micro molar

µm – Micrômetro

Arg – Arginina

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitroclorobenzeno

CYP450 – Citocromo P450

Cys – Cisteína

Da – Daltons

DHA – Dehidroascorbato

DHAR – Dehidroascorbato redutase

DO – Densidade Ótica

DTT – Ditiotreitól

FMO – Flavina-monooxigenase

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*

GDN – Glutaciona *S*-(2,4-dinitrobenzeno)

GSH – Glutaciona reduzida

GST – Glutaciona *S*-transferase

Glu – Glutamato

HisTag – Cauda de histidina

Ile – Isoleucina

IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosideo

kDa – Quilo Daltons

LABCAI – Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica

LB – Luria Bertani

Lys – Lisina

mm – Milímetro

MXR – *Multixenobiotic resistance*

NaCl – Cloreto de Sódio

nm – Nanômetro

PDB – *Protein Data Bank*

PI – Ponto isoelétrico

Pro – Prolina

RMSD – Desvio médio da raiz quadrática

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

Tyr – Tirosina

UFC – Unidade formadora de colônia

Val – Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OS BIOMARCADORES E O SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO	17
1.2	GLUTATIONA S-TRANSFERASES	19
1.3	GST COMO BIOMARCADOR.....	20
1.4	GST ÔMEGA	21
1.5	QUÍMICA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GST ÔMEGA	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	<i>IN SILICO</i>	26
3.1.1	Alinhamento de sequências e Modelagem 3D	26
3.1.2	<i>Docking</i> molecular	27
3.2	<i>IN VITRO</i>	28
3.2.1	Transformação e Expressão Heteróloga.....	28
3.2.2	Purificação.....	28
3.2.3	Teste de atividade	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	30
4.1.1	Parâmetros moleculares e alinhamento de sequências.....	30
4.1.2	Modelagem 3D e construção do dímero.....	33
4.1.3	<i>Docking</i> molecular com pequenos ligantes	40
4.2	ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	46
4.2.1	Transformação e purificação da proteína	46
4.2.2	Teste de atividade	49
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	51
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A população mundial atual é estimada em 7,9 bilhões de pessoas (WORLDMETER, 2022). As regiões costeiras no Brasil e ao redor do mundo possuem alta densidade demográfica, por uma série de fatores atrativos como a própria localização, disponibilidade de recursos, turismo, lazer, desenvolvimento tecnológico e urbanização. Sendo assim, milhões de pessoas têm optado por viver nessas regiões, e as projeções são para que este número aumente cada vez mais no decorrer dos anos (NEUMANN *et al.*, 2015). Por consequência, diversas fontes poluidoras de origem antropogênica afetam o ambiente marinho próximo à costa, como lixo, pesticidas, esgoto sanitário, industrial e hospitalar, contaminantes gerados por embarcações e outros meios de transporte, e exploração de petróleo (HALPERN *et al.*, 2008, 2015; SEKOVSKI; NEWTON; DENNISON, 2012). Essas regiões marinhas possuem grande importância ecológica, são extremamente ricas em biodiversidade, e detêm expressiva produção de organismos aquáticos para consumo humano, oriundos das atividades de pesca e aquicultura, essenciais para o incremento da economia local. Esse ambiente e atividades econômicas, no entanto, podem estar ameaçados devido aos impactos constantes das ações antrópicas (DUMBAULD; RUESINK; RUMRILL, 2009). Em virtude disso, ferramentas aprimoradas para a avaliação e/ou quantificação deste impacto são necessárias para que medidas de identificação, remediação ou prevenção possam ser tomadas. Essas ferramentas auxiliam na identificação, por exemplo, de melhores locais para cultivo de organismos marinhos ou caracterizam a situação ecológica do ambiente, uma vez que a saúde dos organismos pode também ser estimada.

1.1 OS BIOMARCADORES E O SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Dentre os organismos naturais da região costeira e de cultivo mais comuns, estão os moluscos bivalves, os quais, devido suas características morfofisiológicas, são considerados bastantes adequados como organismos sentinela em programas de avaliação e monitoramento ambiental, por meio de análises de alterações bioquímicas e moleculares (BELIAEFF; BURGEOT, 2002; FOWLER, 2005; ICARUS ALLEN; MOORE, 2004; MOORE *et al.*, 2004; RODRÍGUEZ-ORTEGA *et al.*, 2002). A ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, é um dos moluscos bivalves mais cultivados (FAO, 2018). Por se tratar de uma espécie de ampla distribuição geográfica, sésil, de fácil manuseio, filtradora, com tempo de sobrevivência longo e capacidade de bioacumulação de contaminantes, diversos

estudos com biomarcadores envolvendo este organismo vêm sendo realizados, com a finalidade de refinar e enriquecer sua utilização em estudos de biomonitoramento ambiental para avaliação de impacto pela presença de xenobióticos (LUNA-ACOSTA *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2017; REMENTERIA *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2019).

Os xenobióticos, moléculas exógenas ao organismo, quando em altas concentrações podem ser tóxicos (CROOM, 2012). Uma característica comum aos xenobióticos é a natureza eletrofílica, ou seja, deficiência em elétrons. Esta característica faz com que sejam bastante reativos, principalmente com moléculas de natureza nucleofílica, capazes de doar elétrons, como os grupos tióis ou sulfidrilas, presentes por exemplo em resíduos de cisteína de proteínas ou pequenas moléculas (SATO; MCKERCHER; LIPTON, 2013). Uma vez nas células, os xenobióticos podem desencadear estresse oxidativo, e como consequência, respostas moleculares a este estado. Essas respostas, quando mensuradas de forma acurada, têm potencial para tornarem-se biomarcadores.

Os biomarcadores são parâmetros biológicos que podem ser determinados quantitativamente e possuem correlação com efeitos ambientais e/ou químicos sobre o organismo. Esses efeitos podem caracterizar modificações bioquímicas, ou produto delas, detectáveis e provenientes no organismo, que possam indicar intensidade de exposição ou risco à saúde (AMORIM, 2003). Devido à complexidade das informações fornecidas pelos organismos sobre as condições do ambiente onde se encontram, muitos estudos ainda precisam ser realizados e muito ainda há para se compreender. Diversos possíveis biomarcadores já foram identificados, como as enzimas superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT), pertencentes a vias de resposta ao estresse oxidativo (TENG *et al.*, 2021), entre outras. Há atenção especial às enzimas envolvidas no sistema de biotransformação, estas rotas metabólicas envolvendo essa maquinaria enzimática são capazes de biotransformar xenobióticos, facilitando sua eliminação do organismo (RAND, 1995; SACCO, 2006). O processo de biotransformação destes compostos exógenos envolve enzimas de fase I, II e III. A fase I, ou fase de reações redox, são catalisadas principalmente por citocromos P450 (CYP450) e flavinas-monooxigenases (FMOs), modificando os compostos por meio de redução, oxidação ou hidrólise. Essa transformação torna os xenobióticos mais reativos, criando centros eletrofílicos, e facilitando a biotransformação que pode ocorrer na fase II (BOUTET, Isabelle; TANGUY; MORAGA, 2004a; NIYOGI *et al.*, 2001). A fase II, ou fase de conjugação, pode catalisar a conjugação dos compostos biotransformados na fase I ou que já possuem centro eletrofílico, com moléculas endógenas. A glutatona reduzida (GSH), um tripeptídeo, é um dos substratos utilizados para esta

conjugação, que torna o xenobiótico biotransformado mais solúvel (SHARMA *et al.*, 2004). As glutathione *S*-transferases (GSTs) são enzimas importantes nas vias de biotransformação de fase II, e utilizam GSH no processo de conjugação (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Uma vez conjugados, os xenobióticos podem sofrer ação das enzimas da fase III, componentes do sistema de resistência a múltiplos xenobióticos (*multixenobiotic resistance* – MXR) e sendo transportados para fora da célula.

Estudos com biomarcadores possuem e demonstram grande potencial para prevenção ou avaliação de impacto nos ambientes costeiros. Diferente dos sensores químicos que avaliam parâmetros únicos e isolados, sem contexto necessariamente biológico, a utilização de organismos vivos para o biomonitoramento mostra dados complexos e bastante completos sobre a situação do ambiente e de sua ecologia. Em decorrência dessa complexidade, muitas lacunas ainda restam para identificar com precisão o impacto gerado nesses ambientes com a utilização de biomarcadores. A ostra é um organismo com grande potencial de utilização em análises de biomonitoramento ambiental devido ao seu hábito e características morfofisiológicas, como por exemplo, a presença de alterações bioquímicas, moleculares e anatômicas quantificáveis em resposta às condições ambientais. Porém, mais estudos são necessários para a compreensão de seus mecanismos de resposta e, conseqüentemente, para o aprimoramento de sua utilização nesse processo.

1.2 GLUTATHIONE *S*-TRANSFERASES

Entre os sistemas de biotransformação de fase II, destacam-se as proteínas da família glutathione *S*-transferase, as quais, além de xenobióticos, também conjugam subprodutos do metabolismo oxidativo e uma série de compostos carcinogênicos (BOUTET, I.; TANGUY; MORAGA, 2004b). Em mamíferos, as moléculas conjugadas com a glutathione passam por processos de clivagem até derivados de cisteína, que posteriormente são acetilados por enzimas localizadas principalmente nos rins. Esse processo de acetilação gera os chamados ácidos mercaptúricos, que são conjugados de N-acetilcisteína. Os derivados destes ácidos são finalmente excretados via urina (GILMAN, 1996). Diversas isoformas fazem parte da grande família das GSTs. Em mamíferos, foram identificadas classes citosólicas (Alfa, Mi, Pi, Sigma, Theta, Ômega e Zeta), mitocondriais e microssomais de GST (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; PEMBLE; WARDLE; TAYLOR, 1996), e ainda existem classes exclusivas de grupos não-mamíferos, como Rho, Beta, Phi, Tau, Delta, Kappa e Epsilon (SHEEHAN *et al.*, 2001; SORANZO *et al.*, 2004). No entanto, para moluscos

bivalves, ainda há dúvidas sobre a totalidade e a identificação de isoformas de GSTs. Martins *et al.* (2014) realizou um perfil proteômico de GSTs citosólicas em três espécies de bivalves e identificou isoformas das classes Mi, Pi e Sigma. Zacchi *et al.* (dados não publicados) utilizaram dados públicos do genoma e de transcriptomas de *C. gigas* e identificaram genes ortólogos das classes citosólicas Kappa, Ômega, Rho, Sigma, Alpha, Pi, Mi, Delta e Theta. Este trabalho propiciou o desenho de iniciadores para a identificação da transcrição basal destes genes em diferentes tecidos da ostra (DECONTO, 2019). As classes de GST são classificadas de acordo com a função, homologia de estrutura, atividade enzimática e quanto aos resíduos de aminoácidos presentes em seu sítio catalítico. No domínio N-terminal, sítio de interação com a GSH, existem resíduos característicos, como os da região de estabilização do ânion tiolato da GSH ou motivo $\beta\alpha\beta$ e os do motivo $\beta\beta\alpha$, que variam entre as classes de GST e ajudam na classificação. Para a ômega, o resíduo ativo do motivo $\beta\alpha\beta$ é a cisteína, as classes Sigma, Mi, Pi e Alfa possuem uma tirosina e as Rho e Theta possuem uma serina nesta mesma posição. No motivo $\beta\beta\alpha$, dois resíduos são considerados de importância catalítica: Rho, Ômega e Theta possuem Glutamato e Serina, Sigma, Mi e Pi apresentam glutamina e serina, e apenas a Alfa possui glutamina e treonina. A região C-terminal da proteína, envolvida na ligação com o composto eletrofílico, é a região de maior variação entre as classes, e também auxilia na classificação e caracterização da atividade específica das isoformas (AWASTHI, 2006).

1.3 GST COMO BIOMARCADOR

Em estudos com biomarcadores envolvendo moluscos bivalves do gênero *Crassostrea*, as GSTs frequentemente apresentam alterações significativas. Em análises mais específicas como a de transcritos ou cinética enzimática, esta superfamília vem demonstrando transcrição elevada ou maior atividade catalítica frente a desafios com xenobióticos ou fatores abióticos. Quando analisada a transcrição basal de genes de isoformas de GST em diferentes tecidos de *C. gigas*, a classe ômega teve maior prevalência em glândula digestiva (13,6 vezes) para a isoforma GSTO2.1 e no palpo labial e glândula digestiva (17,5 e 10 vezes respectivamente) para a isoforma GSTO1 em relação aos outros tecidos analisados (DECONTO, 2019). Em outros trabalhos realizados pelo grupo do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (LABCAI/UFSC), utilizando moluscos do gênero *Crassostrea*, foi identificada diferença significativa para a isoforma ômega em seus níveis de transcritos em

diferentes situações, como exposição ao fenantreno em diferentes salinidades (ZACCHI *et al.*, 2017), temperaturas (LIMA *et al.*, 2018) e pH (LIMA *et al.*, 2019), além de resposta a diferentes ambientes de cultivo com salinidade variada (ZACCHI *et al.*, 2018). Nesses estudos, a atividade GST total também foi quantificada e apresentou diferenças entre animais controle e expostos ou entre ambientes. Apesar de quantificada a atividade GST total, a atividade catalítica da isoforma ômega pode não ter sido contemplada de forma significativa, uma vez que há evidências controversas sobre a utilização do 1-cloro-2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) para testar sua atividade, substrato este padrão utilizado para medir a atividade GST total de um extrato. Segundo AWASTHI (2006), as GST de classe ômega possuem pouca ou nenhuma atividade GST envolvendo este substrato clássico. Em uma isoforma da classe ômega identificada para a espécie *Bombyx mori*, a atividade GST com CDNB foi quantificável e considerada regular (YAMAMOTO *et al.*, 2013). Já em relação às isoformas ômega 1.1 e 2.2 humanas, a atividade GST com CDNB foi considerada ineficiente, ou muito baixa, e não detectável respectivamente para as isoformas (BOARD, 2011). Pouco ou nada se sabe a respeito da utilização de CDNB pela isoforma ômega 2.1 de *C. gigas*, em virtude disso, testes de atividade envolvendo este composto se fazem necessários.

Pouco se sabe sobre as GSTs de moluscos bivalves, como a ostra *C. gigas*, em comparação com as de mamíferos, mesmo havendo diversos estudos envolvendo esta família de proteínas. Por se tratar de uma grande família com diferentes isoformas, há diferenças marcantes quanto a sua configuração estrutural e composição de resíduos, utilização de substratos, susceptibilidade a inibidores, função em geral e prevalência nos tecidos dos organismos. Isso sugere fortemente, principalmente com base nas informações já publicadas sobre diferentes isoformas de diversas espécies, que as isoformas de GSTs podem possuir funções diferentes. Assim, a caracterização isolada de uma isoforma pode trazer informações importantes para uma boa aplicabilidade das técnicas envolvendo biomarcadores.

1.4 GST ÔMEGA

Em situações de estresse oxidativo, a classe ômega pode desempenhar um importante papel no sistema de remoção de espécies reativas de oxigênio, devido à sua atividade dehidroascorbato redutase, uma etapa da via metabólica que envolve a utilização do ácido ascórbico como agente redutor para eliminar peróxido de hidrogênio (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Como citado anteriormente, CDNB pode ser um substrato

controverso para analisar a atividade GST da isoforma ômega. Em isoformas desta classe de GST de porcos, foi identificada identidade preservada acima de 70% em comparação com isoformas ômega de rato, camundongo e humana. Deste modo, sugere-se que a atividade dehidroascorbato redutase (DHAR) dependente de GSH, etapa envolvida na ação antioxidante do organismo, já identificada nos mamíferos citados, pode ser atribuída a isoforma identificada em porcos *Sus scrofa domesticus* (ROUIMI *et al.*, 2001). Foi descrito que a subfamília ômega humana catalisa reações diferentes das normalmente atribuídas às GSTs, muito similares às glutarredoxinas ou tiorredoxinas, como reações tiol transferase e redução do monometilarsênico, um dos subprodutos da biotransformação do arsênico (WHITBREAD *et al.*, 2005). Pouco se sabe sobre a atividade das isoformas ômega de bivalves, particularmente as de *C. gigas*. Deconto (2019) identificou que a isoforma ômega 2.1 tem transcrição basal elevada na glândula digestiva de *C. gigas*, tecido que é alvo constante de estresse oxidativo. Sendo a ômega uma isoforma com potencial explorável para responder a este tipo de estresse e por possuir atividade dehidroascorbato redutase, a caracterização estrutural e funcional da isoforma CgGSTO2.1 com o substrato dehidroascorbato são necessários para a identificação da função desta isoforma, em *C. gigas*. Levando estas informações em consideração, a isoforma demonstra ser um bom alvo de estudos estruturais e funcionais, devido a sua possível relevância no processo de biotransformação e defesa antioxidante do organismo em questão, aumentando as possibilidades de seu uso em programas de biomonitoramento ambiental.

1.5 QUÍMICA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GST ÔMEGA

A classe ômega das GST apresenta a conformação canônica atribuída à superfamília em questão, sendo a região N-terminal bem conservada, formada por 3 alfa-hélices e 4 folhas-beta, e a região C-terminal formada apenas por alfa-hélices que variam em número entre 5 e 7 em média (BOARD *et al.*, 2000). Muitas das características foram mantidas de sua estreita relação evolutiva com as tiol-transferases, oriundas de bactérias (AWASTHI, 2006). De modo geral, essa atividade é proveniente da presença de resíduos de cisteína internos ao bolsão de ligação, que podem atuar como um simples doador de prótons, gerar ataques nucleofílicos a compostos eletrofílicos ou catabolizar conjugações, promovendo atividades como tiol transferase e dehidroascorbato redutase, remanescentes da ancestral tiorredoxina (BOARD *et al.*, 2000; GIRARDINI *et al.*, 2002). Esta classe, assim como todas as classes citosólicas, também é dimérica. No entanto, não há evidências concretas sobre a necessidade

do dímero como um todo para desencadear reações, uma vez que já foram encontradas evidências de uma isoforma ômega de *Schistosoma mansoni*, equivalente a apenas a região N-terminal da proteína (104 resíduos) capazes de desempenhar atividade GST, dehidroascorbato redutase e tioltransferase (GIRARDINI *et al.*, 2002). A importância da região N-terminal das GST é bem estabelecida, e isto é evidenciado o tempo todo em alinhamentos de sequência. A cisteína catalítica, presente no motivo $\beta\alpha\beta$, pode formar ponte dissulfeto com a GSH, diferente das outras isoformas que normalmente possuem tirosina ou serina. Em seu motivo $\beta\beta\alpha$, ainda na região N-terminal, estão presentes os resíduos glutamato e serina, que também ajudam a estabilizar a glutatona reduzida no sítio catalítico realizando interações fracas com a porção gama-glutamil da glutatona. O resíduo de lisina, presente na alça entre os motivos $\beta\alpha\beta$ e $\beta\beta\alpha$, realiza interações fracas com o grupo carboxila da parte glicínica da glutatona. A reação mais conhecida para GST em geral é a envolvendo o composto CDNB, na qual a enzima catalisa uma conjugação de uma molécula de GSH com esse composto, formando um novo composto chamado glutatona S-(2,4-dinitrobenzeno), ou GDN. Essa reação é capaz de ocorrer de forma espontânea, em meio gasoso ou líquido (ZHENG; ORNSTEIN, 1997). As GST são capazes de acelerar muitas vezes a taxa de conjugação entre essas moléculas, como é esperado de uma enzima. A reação envolvendo a enzima se inicia, no caso da classe ômega, pela formação de uma ponte dissulfeto entre glutatona e cisteína catalítica. Uma vez formada, a cisteína promove um ataque nucleofílico no CDNB, liberando o íon Cloro e conjugando a GSH com o carbono 1 do dinitrobenzeno.

A cisteína catalítica da classe ômega desempenha papel fundamental nas diversas reações que esta classe de enzimas consegue realizar. Em relação a atividade redutase, a cisteína é capaz de catalisar a redução da glutatona s-(fenacil), composto formado de forma espontânea pela reação da GSH com o 2-cloroacetofenona (gás-lacrimogênio), gerando acetofenonas, de menor toxicidade ao organismo (BOARD, 2011). Também é capaz de reduzir moléculas de dehidroascorbato (DHA), regenerando o ácido ascórbico disponível para combate ao estresse oxidativo. Para tal, dois mecanismos são propostos, uma vez que não se sabe com clareza como a reação ocorre *in vivo*: a) a forma aniônica da cisteína doa um elétron para a molécula de DHA, formando um radical estável semi-dehidroascorbato. Uma molécula de GSH doa um próton para o semi-dehidroascorbato formando o ácido ascórbico. A cisteína se une a forma radical da glutatona resultante por ponte dissulfeto, até ser regenerada por uma segunda molécula de GSH. b) a reação ocorre de forma simultânea onde cisteína e GSH doam seus prótons ao dehidroascorbato. Regenerando o ácido ascórbico, e formam uma ponte dissulfeto até a chegada de outra molécula de GSH, regenerando a

cisteína em sua forma protonada e produzindo uma GS-SG, que entrará no ciclo das glutathione redutases (ZHOU *et al.*, 2012).

Esses mecanismos de reação são majoritariamente analisados em isoformas de GST humanas, ou de outras espécies de interesse, como mamíferos de criação ou vegetais de cultivo. No entanto, não há registros desta categoria referentes a isoformas de ostra *C. gigas*, ou de qualquer outra espécie de molusco, segundo nossas buscas. Compreender melhor essas reações para a isoforma Ômega 2.1 de *C. gigas* pode ser um início para o entendimento das demais isoformas em ostras e moluscos em geral. Diferentes tecnologias podem auxiliar na compreensão desses mecanismos bioquímicos, por meio de ferramentas de bioinformática como modelagem 3D e *Docking* molecular, ou pela produção da proteína recombinante de forma heteróloga, a qual permite realizar ensaios de atividade com a proteína isolada, gerando caracterizações mais precisas. O presente estudo se propõe a atingir esses objetivos por meio das ferramentas *in silico* e *in vitro* citadas, para uma maior compreensão da proteína em questão e sua potencial utilização como biomarcador na ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcional e estruturalmente a isoforma 2.1 de Glutathione *S*-transferase Ômega de *Crassostrea gigas*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a proteína estruturalmente por modelagem 3D;
- Analisar o *docking* molecular com molécula de Glutathione, Glutathione S-(2,4-dinitrobenzeno) e Dehidroascorbato;
- Expressar e purificar a isoforma CgGSTO2.1 recombinante (rGSTO2.1);
- Testar a atividade enzimática da rGSTO2.1 com os substratos 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e Dehidroascorbato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Em estudo prévio realizado pelo LABCAI (dados não publicados), foi realizada uma triagem do genoma de *Crassostrea gigas*, o qual foi depositado (ZHANG, Guofan *et al.*, 2012) e atualizado (WANG *et al.*, 2019) no banco de dados GigaDB (gigadb.org/dataset/100030). Este estudo de Zhang e colaboradores (2012) também dispõe de *Reads* de transcriptomas, de diferentes tecidos desta espécie, os quais foram mapeados contra o genoma. Os transcritos de GST foram identificados por meio de comparações com bancos de dados de proteínas (*Protein Data Bank* e Uniprot). A sequência de aminoácidos da isoforma CgGSTO2.1* foi obtida a partir da tradução da sequência de nucleotídeos, depositada no banco de dados NCBI sob o número de acesso XP_011429380.2.

*MSEKALGRGSQCPPLAPGTLRLLYSMRFCPYAQRTRLALLHKNIEFETVNI
NLKQKPDWFRARNPIGLVPVLEFDDKIVYESNVCNEYLDNIYPTPKLIPTDFYRASR
DKMLWETFGKVTELFYEIPKSVADGSLDKCIRRYERQLRRYESELSNRGEYFGGSS
PCMVDPMIWPWFERIPVLTIIAPEAEIDPNKFPHLSSWMKLMELPAVRETYEEPTS
HVHFFSSLRAGNPDYDYGLK

3.1 IN SILICO

3.1.1 Alinhamento de sequências e Modelagem 3D

CgGSTO2.1 foi analisada na ferramenta ExPASy ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005) para estimativa das características físico-químicas da proteína e melhor direcionamento nas atividades *in vitro*. Também foi analisada pela ferramenta BLASTp (CAMACHO *et al.*, 2009), para busca e identificação de sequências com identidade acima de 15% e que possuíssem modelos tridimensionais com dados de atividade públicos, utilizando como referência o *Protein Data Bank* - PDB (BERMAN *et al.*, 2000). CgGSTO2.1 foi alinhada com outras sequências, selecionadas na etapa anterior, na plataforma *online* MUSCLE (EDGAR, 2004). Os dados do alinhamento foram analisados na ferramenta JalView (WATERHOUSE *et al.*, 2009). Os modelos tridimensionais das sequências foram visualizados no *software* UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004), para estimativa dos pontos de contato para dimerização, da bolsa de ligação e resíduos de interesse. O modelo tridimensional de CgGSTO2.1 foi construído na plataforma I-TASSER *online server* (ZHANG, Yang, 2008), a qual realiza a predição da estrutura pelo método de *threading*, construindo o modelo por fragmentos, de forma híbrida e comparativa. O modelo

tridimensional da sequência, baseado em cristalografia de raio X, de maior identidade foi utilizado como *template* para calcular o desvio médio da raiz quadrática (RMSD) do modelo de CgGSTO2.1 no software SuperPose (MAITI *et al.*, 2004). Para avaliação geral da estrutura do modelo, e reconhecimento de possíveis erros, o valor de Z-score foi acessado com a ferramenta *Protein Structure Analysis - ProSA-Web* (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

3.1.2 Docking molecular

A dimerização do modelo, construída por *docking* proteína-proteína, foi realizada no software HADDOCK (DE VRIES; VAN DIJK; BONVIN, 2010). Resíduos periféricos da proteína pertencentes às alfa-hélices α_3 e α_4 , região de dimerização de acordo com o observado em outros modelos diméricos de GST, foram marcados como ativos e flexíveis. A qualidade do dímero foi acessada nas plataformas *online* ProSA Server para valor de Z-score, SuperPose para reavaliação do RMSD com a referência 1EEM e *Ramachandran plot server* para gráfico de Ramachandran (ANDERSON *et al.*, 2005). Os ensaios de *docking* molecular com ligantes foram feitos na plataforma *online* DockThor (GUEDES *et al.*, 2021). Os ligantes utilizados foram Glutathiona reduzida (GSH), Glutathiona S-(2,4- dinitrobenzeno) (GDN) e Dehidroascorbato (DHA), tendo para cada um deles um modelo de referência de ligação: PDB 1EEM, 6F4F e 3VLN, respectivamente. Um *redocking* dos ligantes de cada estrutura modelo foi realizado para obtenção de valores estimados de energia livre de Gibbs (ΔG) para referência. O *docking* envolvendo o modelo construído para CgGSTO2.1 foi inicialmente realizado de forma cega, sem delimitação de espaço, e posteriormente com caixa de ligação (20 x 20 x 20 Å), posicionada na região estimada como sendo a cavidade de ligação, com base na visualização dos modelos de referência, respeitando a internalização de resíduos considerados importantes para as reações. Os resíduos posicionados no interior da caixa são mantidos rígidos por natureza do *software*. Para os ligantes GSH e GDN, a cisteína do sítio ativo foi mantida desprotonada. A seleção da melhor pose para o *docking* com ligantes, foi baseada no equilíbrio entre o menor RMSD em relação a referência de cada ligante, menor ΔG em comparação com o *redocking* e maior proximidade com resíduos de interesse. A visualização, análise dos resultados e captura de imagens foram feitas no programa UCSF Chimera.

3.2 *IN VITRO*

3.2.1 Transformação e Expressão Heteróloga

O gene da isoforma CgGSTO2.1 de *C. gigas* foi sintetizado pela empresa GenOne em vetor de expressão pET-19b, o qual adiciona ao gene uma sequência codificante para uma cauda poli histidina na porção N-terminal da proteína, e sítio de clivagem da cauda pela enzima Enterocinase como demonstrado a seguir: MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDK. O vetor com o gene foi introduzido em *Escherichia coli* BL21 DE3 (pLysS) pelo método de *heat shock* (FROGER; HALL, 2007), e as unidades formadoras de colônias (UFCs) transformadas foram selecionadas em placas de Petri contendo meio Luria Bertani (LB) sólido enriquecido com Ampicilina e Cloranfenicol. As UFCs resistentes foram transferidas a meio líquido (LB *Broth*) enriquecido com os mesmos antibióticos e cresceram nas mesmas condições anteriores, em agitação à 37°C *overnight* como pré-inóculo. Deste pré-inóculo, foi transferido 1 ml para 250 ml de meio líquido, também enriquecido com antibióticos, e cresceram nas mesmas condições. Ao atingirem a densidade ótica de 0.6 medida a 600 nm por espectrofotometria, isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado ao meio a 1 mM de concentração final para indução da expressão. Aliquotas do meio foram coletadas em 0, 1, 2, 3 h de crescimento para avaliação por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) do conteúdo proteico e estimativa das condições ótimas de expressão. Ao final do período de expressão, as culturas foram centrifugadas (3645 x g, por 15 min a 4° C) e o sedimento bacteriano obtido foi congelado para a purificação.

3.2.2 Purificação

Ao sedimento bacteriano foi adicionado tampão de lise 50 mM Tris (pH 8.0), 250 mM NaCl, 10 mM Imidazol, DTT 0,5 mM e Glicerol 30% e submetido à sonicação, 34% de amplitude por 10 min, com ciclos de 30 seg de ativação e 30 seg de descanso, em gelo. O homogeneizado foi centrifugado (12000 x g 20 min 4°C), e o sobrenadante separado do precipitado. Aliquotas do sobrenadante e do precipitado foram analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida TGX *FastCast* kit 12% para identificação da presença da proteína recombinante nas frações. A proteína foi purificada do sobrenadante por cromatografia de afinidade no equipamento ÄKTApurifier *fast protein liquid chromatography* (FPLC) em

coluna de afinidade por histidina (*Histrap* HP), em tampão 50 mM Tris (pH 8.0), 250 mM NaCl, 100 mM arginina, 10 mM Imidazol, DTT 0,5 mM e Glicerol 30%. A proteína foi eluída da coluna no mesmo tampão anterior por concentrações crescentes de Imidazol no sistema até um máximo de 500 mM. O procedimento de cromatografia líquida teve todas as suas etapas coletadas para análise por *SDS-PAGE*. As frações referentes ao pico de maior absorvância durante a eluição, com confirmação do conteúdo proteico em gel, foram suplementadas com um tampão de estabilização para 500 mM final de arginina. As alíquotas de proteína purificada passaram por duas etapas de diálise, uma durante a noite a 4° C e outra de 4h de duração em mesma temperatura, ambas em agitação (50 mM Tris pH 8.0, 250 mM NaCl, DTT 0,5 mM, 500 mM Arginina e Glicerol 30%, 1 litro de tampão por etapa) para a retirada do imidazol. As amostras dialisadas foram mantidas refrigeradas a 4° C. O conteúdo de proteína das amostras também foi quantificado pelo método de Bradford antes e após as diálises.

3.2.3 Teste de atividade

A proteína recombinante rCgGSTO2.1 foi concentrada em tubo concentrador de 10 kDa de *cut-off*. O teste ocorreu com a cauda poli histidina, em espectrofotômetro e fluorímetro (Spectramax M5), para atividade glutationa *S*-transferase e dehidroascorbato redutase. Em duplicatas, o ensaio contou com 10 µl de proteína recombinante purificada, dialisada e concentrada (0,8 mg/ml) e tampão da diálise como branco da reação. As amostras receberam 100 µl de meio de reação contendo 100 mM tampão fosfato pH 7,0, 1 mM GSH e foram incubadas por 5 minutos a 30° C. Após a adição de 100 µl dos substratos testados, os dados foram obtidos por leituras intermitentes de 15 segundos por um período de 10 minutos para avaliar o aumento na absorvância, a 340 nm para o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (2,5 mM final) e 265 nm para DHA (0,5 mM final). Ambos os substratos foram preparados também em tampão fosfato pH 7,0 e mantidos a 30° C até a aplicação na reação. O cálculo da atividade GST da amostra foi realizado utilizando a equação 1, na qual $\epsilon = 9,6$ mM/cm, valor referente ao coeficiente de extinção molar do substrato CDNB.

$$Atividade = \left(\frac{\frac{Absorbância/min}{\epsilon} \times Vol. total}{[Proteína] \times Vol. amostra} \right) \times Diluição \quad (1)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES *IN SILICO*

4.1.1 Parâmetros moleculares e alinhamento de sequências

A sequência de aminoácidos de CgGSTO2.1 foi analisada no software ExPASy ProtParam, e apresentou 240 resíduos e massa teórica de 28112,31 Da (~28 kDa). Polar, possui 32 resíduos carregados negativamente e 31 carregados positivamente, demonstrando assim um ponto isoelétrico (pI) teórico de 6,46. Com a adição dos resíduos referentes à cauda polihistidina, a sequência passa a ter 262 resíduos com massa teórica de 30742 Da (~30 kDa). 36 resíduos carregados negativamente e 32 positivamente. O índice de instabilidade obtido foi de 50,87 para esta sequência, 50,77 com a cauda, considerando a proteína instável em ambas situações. Esta instabilidade é vinculada ao tempo de meia-vida da proteína *in vivo*, sendo > 16h considerado estável e < 5h como instável. Este valor é produto de uma correlação entre a presença de dipeptídeos que, estatisticamente, conferem instabilidade à proteína e o comprimento da sequência. Estes dipeptídeos são variados e possuem colaborações diferentes na instabilidade. Da correlação, surge um valor, o qual quando acima de 40 classifica a proteína como sendo instável (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990). Corroborando com essa informação, de fato houve uma necessidade de tampões mais concentrados ou com maior força iônica e/ou redutiva, com a finalidade de aumentar a estabilidade da proteína, quando purificada.

Com o objetivo de identificar propriedades entre sequências conservadas de outras espécies, foram selecionadas 8 sequências de proteínas ou isoformas pertencentes a 5 espécies: *Bombyx mori* (Bicho-da-seda), *Homo sapiens*, *Oryza sativa japonica* (Arroz), *Trametes versicolor* (Fungo Cauda-de-perú) e *Neisseria gonorrhoeae* (bactéria gram-negativa). A seleção das sequências foi baseada na maior similaridade. De todas as sequências alinhadas, a que apresentou maior identidade com a sequência completa de CgGSTO2.1 foi a isoforma humana ômega 1.1, com ~40% de identidade preservada. As demais sequências apresentaram identidades entre 38,5 e 17,6 (Tabela 1). Sabe-se da importância das regiões dos motivos $\beta\alpha\beta$ e $\beta\beta\alpha$ na estruturação e atividade da enzima em questão, uma vez que posicionam e sustentam a tríade catalítica (MFEKA *et al.*, 2020). O alinhamento dos recortes dessas regiões apresentou

maior identidade em geral, quando comparados à identidade da sequência completa. As enzimas da superfamília GST são conhecidas por apresentarem baixa similaridade entre sequências, mas alta similaridade estrutural, e em virtude disso, algumas sequências genômicas podem passar despercebidas e não serem classificadas adequadamente em sua classe de GST em situações de triagem (WILCE; PARKER, 1994). Mediante os valores obtidos de identidade preservada entre sequências e disponibilidade de dados científicos em geral, a sequência de *H. sapiens* ômega 1.1 foi selecionada como um modelo comparativo aos estudos estruturais *in silico* e de atividade da CgGSTO2.1.

Tabela 1 – Valores de identidade das sequências selecionadas em comparação com a isoforma ômega 2.1 de *Crassostrea gigas* (%). Comparações entre sequências completas e recortes das regiões dos motivos $\beta\alpha\beta$ e $\beta\beta\alpha$ alinhadas com as das espécies *Bombyx mori* (PDB-3WD6), *Homo sapiens* 1.1 (PDB-3VLN) e 2.2 (PDB-3Q18), *Oryza sativa japonica*(PDB-5D9V), *Trametes versicolor* 1C (PDB-6HJS), 2C (PDB-6SRA), 3C (PDB-6SRB) e *Neisseria gonorrhoeae* (PDB-4HOJ) no programa MUSCLE.

	CgGSTO2.1	N-terminal	C-terminal	Motivo $\beta\alpha\beta$	Motivo $\beta\beta\alpha$
<i>B. mori</i>	33,33	49,44	24,83	62,07	51,85
<i>H. sapiens1.1</i>	40,34	55,91	30,71	58,62	55,56
<i>H. sapiens2.2</i>	38,53	51,61	30,43	58,62	48,15
<i>O. sativaDHAR</i>	21,46	31,76	15,20	27,59	33,33
<i>T. versicolor1C</i>	20,83	33,77	12,78	37,93	25,93
<i>T. versicolor2C</i>	17,59	29,87	10,61	31,03	22,22
<i>T. versicolor3C</i>	21,61	33,70	14,69	41,38	37,04
<i>N. gonorrhoeae</i>	23,19	38,16	13,85	37,93	48,15
Média	27,11	40,53	19,14	44,40	40,28

Fonte: Próprio autor.

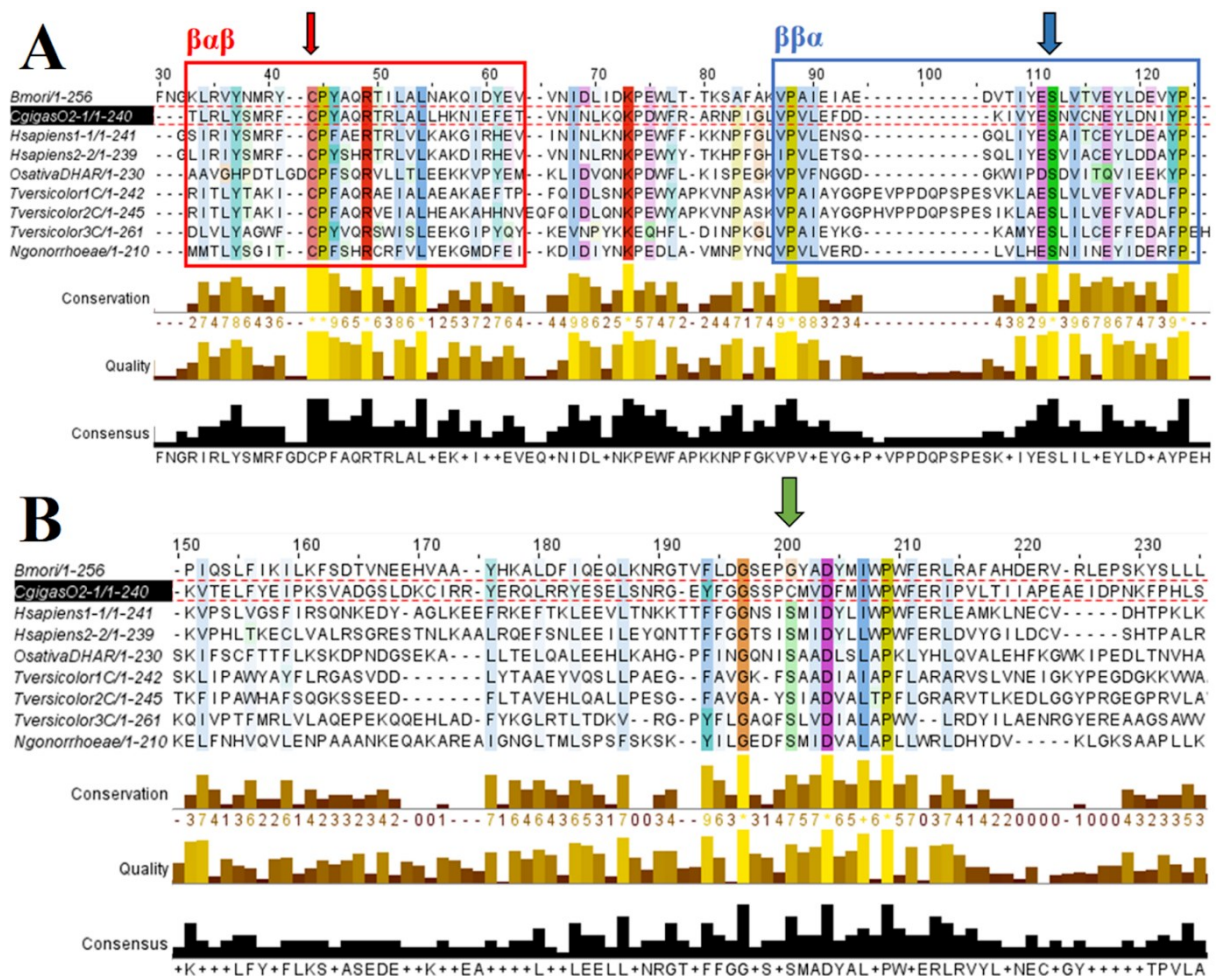
De modo geral, a região N-terminal mostra-se mais preservada quando em comparação com a região C-terminal. Esse resultado é esperado, uma vez que esse domínio é herança evolutiva das tiorredoxinas e está envolvido majoritariamente na ligação com GSH, diferente do domínio C-terminal que está envolvido na ligação com os mais variados compostos, logo, região de maior variabilidade entre sequências (AWASTHI, 2006).

Na Figura 1A, pode-se observar que a cisteína na posição 28 presente no motivo $\beta\alpha\beta$, em CgGSTO2.1, foi preservada 100% entre as sequências, resíduo canônico e característico das isoformas da classe ômega (BOARD, 2011). A maioria das sequências também apresentou o glutamato e a serina do motivo $\beta\beta\alpha$ sem modificações nas posições 80 e 81, respectivamente,

na sequência em CgGSTO2.1. Resíduos como Tyr23, Pro29, Tyr30, Arg33, Ile50, Lys55, Val68, Pro69, Val70, Glu86, Tyr92 e Pro93 também apresentaram identidade preservada acima de 90%. Há evidências envolvendo o resíduo de Arg107 de uma isoforma de GST Mu humana, sobre sua atuação no processo de ionização da GSH levando a um aumento da afinidade de ligação com substratos (PATSKOVSKY; PATSKOVSKA; LISTOWSKY, 2000). Não foram encontrados registros relacionando este mesmo efeito à Arg33 localizada na $\alpha 1$ do motivo $\beta\alpha\beta$ da classe ômega, porém, em virtude da conservação entre sequências, este potencialmente possui algum efeito de importância. Além da arginina, duas tirosinas (23 e 30) também são bastante conservadas entre sequências. Tirosinas no sítio ativo da glutathione redutase humana tem papel crucial na atividade da enzima, por meio de interações com a glutathione e interação direta com o NADPH, onde mutações nesses resíduos diminuem drasticamente a atividade da enzima (KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 1998). A tirosina é um resíduo polar aromático que possui em sua cadeira lateral um grupo fenol, bastante conhecido por ser receptor de grupamentos fosfato transferidos por enzimas tirosina-cinase. Não há referências do papel da tirosina no sítio catalítico da classe ômega, o que se sabe é que em outras classes, o resíduo homólogo à Cys28 do motivo $\beta\alpha\beta$ pode ser substituído por uma serina ou tirosina, critério fundamental na identificação da classe da enzima (AWASTHI, 2006). Resíduos de prolina estão intimamente ligados à formação de alfa-hélices em estruturas (WOOLFSON; WILLIAMS, 1990), levando em conta a importância dos motivos $\beta\alpha\beta$ e $\beta\beta\alpha$ no domínio N-terminal das GSTs, é natural que estes resíduos sejam conservados. Na isoforma 1.1 de GSTO humana, a lisina 59 (Lys55 em CgGSTO2.1) está diretamente envolvida na estabilização da glutathione no sítio catalítico por interação com a porção glicínica da molécula (BOARD *et al.*, 2000). Devido à homologia de sequências e posicionamento espacial, essa lisina possivelmente desempenha a mesma função em CgGSTO2.1. Os demais resíduos conservados entre sequências possuem caráter hidrofóbico e potencialmente estão envolvidos na formação das alfa-hélices do domínio N-terminal ou na estabilização de ligantes na cavidade de ligação por interações hidrofóbicas. Sobre esse tema, não há menções significativas na literatura para a função destes resíduos na classe ômega de GST.

Em relação a região C-terminal, região de maior variabilidade de sequências entre GSTs, apenas a região de alça entre $\alpha 5$ e $\alpha 6$, e na própria $\alpha 6$, foram observados resíduos conservados acima de 90% entre sequências. Nenhuma destas regiões possuem citações relacionando-as à atividade catalítica da enzima. Ainda assim, a presença de uma Cys165 no início da $\alpha 6$ atrai atenção, uma vez que as outras sequências apresentam resíduos de serina nesta posição (Figura 1B).

Figura 1 – Recorte da visualização do alinhamento das sequências, regiões N-terminal (A) e C-terminal (B), no software JalView, selecionadas por identidade acima de 15%. *Bombyx mori*, *Crassostrea gigas*, *Homo sapiens* isoformas 1.1 e 2.1, *Oryza sativa japonica*, *Trametes versicolor* isoformas 1C, 2C e 3C e *Neisseria gonorrhoeae*. Quadros delimitam a região da sequência referentes aos motivos $\beta\alpha\beta$ (vermelho) e $\beta\beta\alpha$ (azul). Setas vermelha e azul indicam resíduos catalíticos em seus respectivos motivos. Seta verde indicando a posição da cisteína 165 em *C. gigas*. Resíduos com identidade preservada acima de 90% apresentam cores fortes variadas.



Fonte: Próprio autor.

4.1.2 Modelagem 3D e construção do dímero

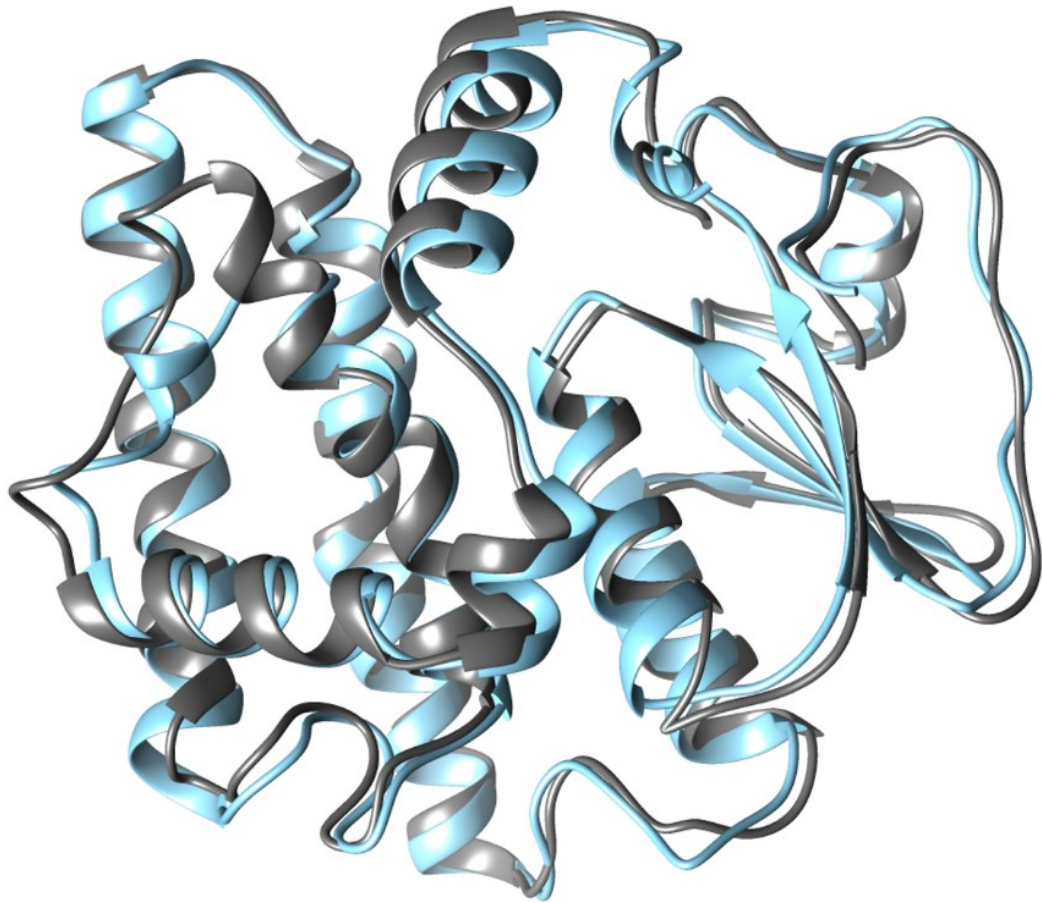
A identificação de GSTs pela sequência de nucleotídeos pode ser limitada. O enovelamento canônico das GST é bastante conservado entre sequências (AWASTHI, 2006). Em virtude disso, a construção de um modelo para a sequência de CgGSTO2.1 é uma estratégia adequada para compreender melhor suas possíveis funções. O modelo nos permite estimar

propriedades da proteína com base em comparações com outras estruturas onde há dados publicados de identificação e testes de atividade. Assim, um modelo para a sequência de aminoácidos de CgGSTO2.1 foi construído na plataforma I-TASSER e apresentou C-score = 1, TM-score = 0,956 e RMSD = 0,74 Å em relação a estrutura usada como molde (*template*) GSTO1.1 humana (PDB 1EEM). A sobreposição do modelo com o *template* de maior identidade pode ser observada na figura 2. Além de maior similaridade de sequência, o modelo construído também apresentou maior similaridade estrutural em comparação com a GSTO1.1 humana. O pacote I-TASSER realiza uma triagem por estruturas análogas no PDB, e sobrepõe estes modelos apresentando seus valores de C-score, TM-score e RMSD. Quanto maior o valor de C-score, mais confiável é o modelo gerado. C-score é um parâmetro de confiança, que normalmente encontra-se entre -5 e 2, onde valores acima de -1,5 são considerados aceitáveis e indicam topologia global correta por parte do modelo. O TM-score é uma métrica calculada baseando-se também no C-score, e pontua a sobreposição e alinhamento entre modelos. Valores de TM-score abaixo de 0,17 indicam modelos pouco sobrepostos, ou seja, estruturas não relacionadas, selecionadas aleatoriamente. Valores de escore acima de 0,5 indicam que os modelos possuem enovelamento muito similar entre si (ZHANG, Yang; SKOLNICK, 2004). O desvio médio da raiz quadrática (RMSD) é uma medida utilizada para calcular a média do desvio ponto a ponto da sobreposição de duas ou mais disposições tridimensionais de pontos em um espaço (normalmente átomos) indicando seu grau de similaridade. Neste caso, para calcular o desvio médio dos átomos de dois modelos sobrepostos. Quanto mais próximo de 0, menor o desvio, ou seja, mais parecidas são as estruturas comparadas (BETANCOURT; SKOLNICK, 2001).

O conteúdo de alfa-hélices e folhas beta também foi estimado, uma vez que o enovelamento da proteína é em geral mais conservado que a própria sequência de aminoácidos (WILCE; PARKER, 1994). Para tanto, formam algoritmos que são capazes de classificar uma GST com base nos domínios e motivos característicos que a mesma apresenta (VUILLEUMIER; PAGNI, 2002). A classe ômega possui uma estrutura terciária típica que pôde ser observada no modelo construído em relação ao posicionamento e número de alfa-hélices e folhas beta (Figura 3). A região N-terminal, composta por 3 alfa-hélices e 4 folhas beta, é onde se localizam os motivos $\beta\alpha\beta$ e $\beta\beta\alpha$, sendo o primeiro integrado pelas estruturas β_1 , α_1 e β_2 , e o segundo pelas β_3 , β_4 e α_3 . A região C-terminal, não possui folhas beta, e é composta por 7 alfa-hélices. Apesar da disposição ser muito parecida, o conteúdo de alfa-hélices entre o modelo construído e a referência humana 1EEM varia. As α_6 e α_7 apresentam apenas um resíduo de separação entre estruturas, diferente de 1EEM, onde essas hélices são consideradas

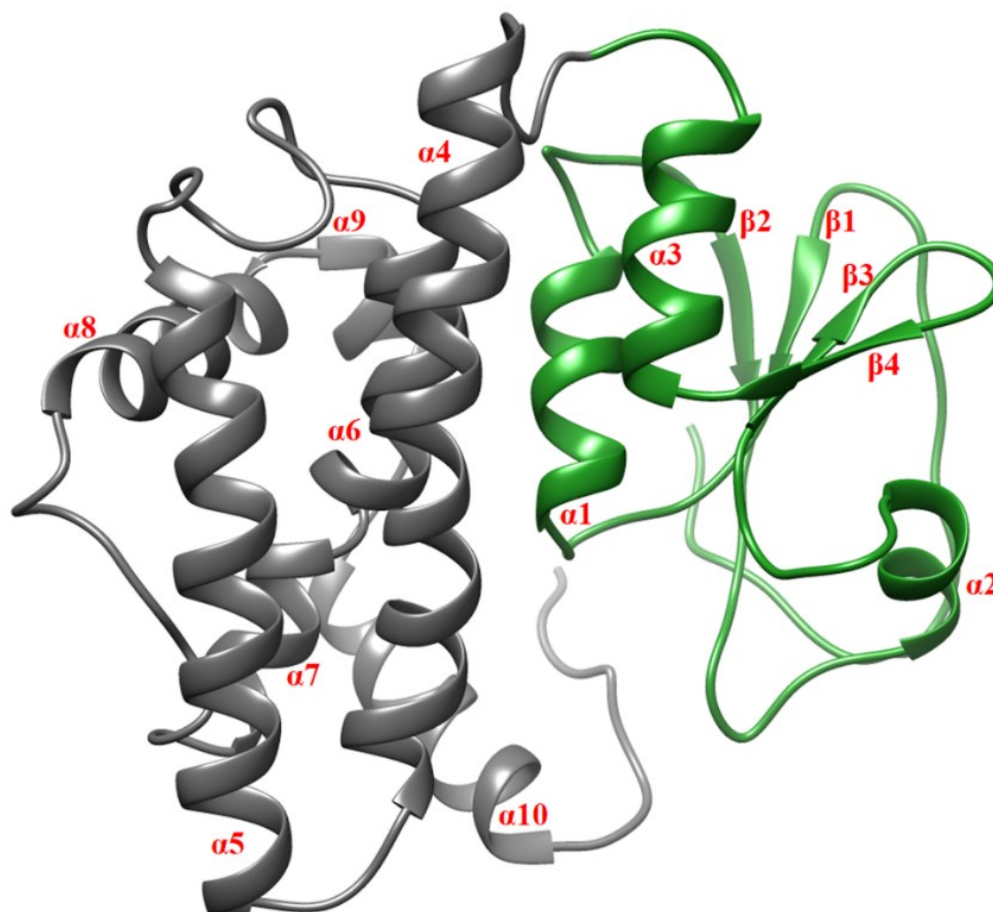
como uma só, e o mesmo acontece para as $\alpha 8$ e $\alpha 9$. No entanto, essas diferenças podem apenas ser um artefato da construção do modelo, e aparentemente não alteram sua conformação geral.

Figura 2 – Sobreposição de modelos monoméricos de GSTO (C-score = 1; TM-score = 0,956; RMSD = 0,74 Å) no UCSF Chimera, exemplificando o enovelamento canônico da superfamília. Em cinza, o modelo criado pela plataforma I-TASSER para CgGSTO2.1. Em azul claro, 1EEM, modelo de GSTO1.1 humana disponível no PDB e selecionado por maior identidade preservada entre sequências.



Fonte: Próprio autor.

Figura 3 – Conteúdo de alfa-hélices e folhas beta-pregueadas do modelo monomérico criado para CgGSTO2.1 na plataforma I-TASSER. Regiões N e C-terminal coloridas em verde e cinza respectivamente. Alfa-hélices anotadas de 1 a 10 e folhas beta-pregueadas anotadas de 1 a 4.

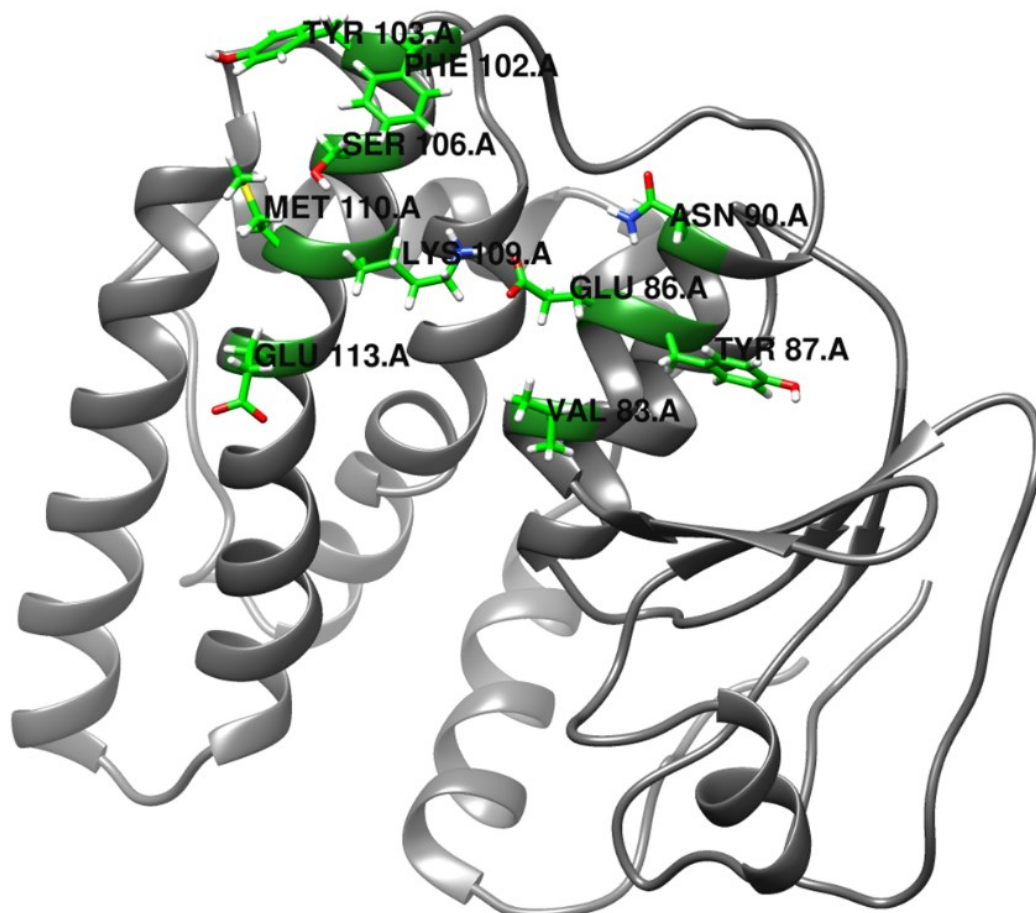


Fonte: Próprio autor.

As GSTs naturalmente são enzimas diméricas que podem formar homo ou heterodímeros. A atividade da enzima pode ser exclusivamente realizada por um único monômero ou pelo conjunto envolvendo seu par dimérico, de mesma classe ou não, e o estado mono ou dimérico pode ter importância fisiológica, uma vez que depende da concentração da enzima (FABRINI *et al.*, 2009). A construção do dímero para CgGSTO2.1 se fez necessária para avaliar o potencial de dimerização do modelo e possíveis interações de resíduos de ambas as cadeias na atividade da CgGSTO2.1. A referência escolhida para comparação, GST Ômega 1.1 humana, não possui a forma dimerizada disponível para download no PDB, apenas visualização na própria página (1EEM). Em virtude disso, o modelo dimérico referente à *Bombyx mori* (3WD6), com dímero disponível para *download*, foi selecionado como referência para a dimerização do modelo de CgGSTO2.1. Segundo nossas análises do dímero 3WD6 e de

outros dímeros de GST, não apenas da classe ômega, o ponto de contato entre monômeros se dá majoritariamente pelas alfa-hélices $\alpha 3$ e $\alpha 4$. O *docking* proteína-proteína do modelo de CgGSTO2.1, feito no programa HADDOCK, sem anotação de resíduos ativos, demonstrou possível dimerização com pontos de contato em regiões aleatórias da proteína. Assim, indicamos como ativos os resíduos com sua cadeia lateral voltada para o lado externo da proteína presentes nas alfa-hélices $\alpha 3$ e $\alpha 4$ em ambos os monômeros (Figura 4).

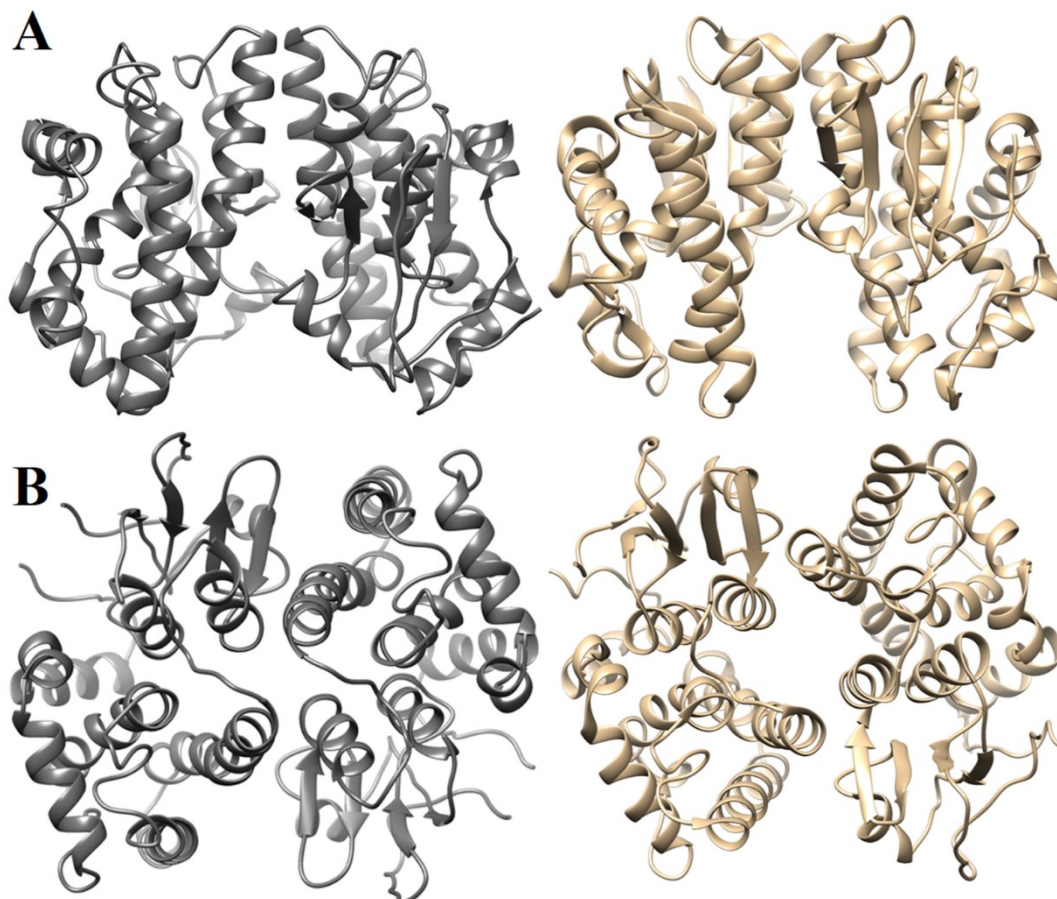
Figura 4 – Monômero de CgGSTO2.1 construído na plataforma online I-TASSER. Em verde, resíduos pertencentes às alfa-hélices $\alpha 3$ e $\alpha 4$, marcados como ativos e flexíveis para a dimerização na plataforma online HADDOCK.



Fonte: Próprio autor.

O dímero resultante da marcação de resíduos ativos das alfa-hélices $\alpha 3$ e $\alpha 4$ apresentou diferentes conformações como resultado, diferentes do visualizado em outras referências diméricas de GST ômega e demais classes. A melhor pose foi selecionada pela menor média de RMSD entre cadeias A e B após a sobreposição de CgGSTO2.1 com o dímero de *Bombyx mori* 3WD6, RMSD = 2,304 Å (Figura 5).

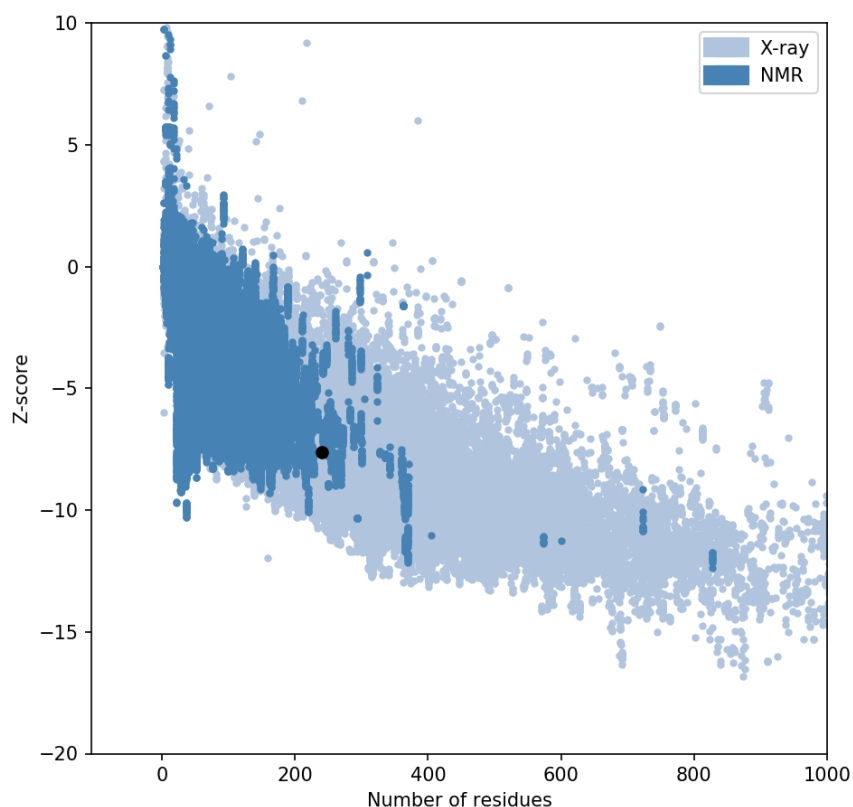
Figura 5 – Comparação entre os dímeros de CgGSTO2.1 (HADDOCK, esquerda) e ômega de *Bombyx mori* PDB 3WD6 (direita) visualizados no UCSF Chimera. Em A, vista lateral do dímero, mostrando o contato entre monômeros. Em B, vista superior evidenciando o ponto de contato entre monômeros referente às alfa-hélices α_3 e α_4 .



Fonte: Próprio autor.

Para validação da qualidade do dímero formado, foi realizada uma avaliação da estrutura da proteína na plataforma online ProSA Web, que compara a estrutura do modelo com outras estruturas depositadas no PDB provenientes de ressonância magnética nuclear (RMN) ou cristalografia de raio X, levando em consideração o tamanho da cadeia polipeptídica (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). A pontuação obtida para o dímero (Z-score) foi de -7,64, a qual enquadra o modelo em uma posição considerada de qualidade no gráfico gerado pela plataforma (Figura 6). Além disso, o RMSD do modelo em relação ao *template* 1EEM foi acessado novamente na ferramenta online SuperPose v1.0, e o valor de RMSD inicial não sofreu alterações após o processo de dimerização por *docking* proteína-proteína.

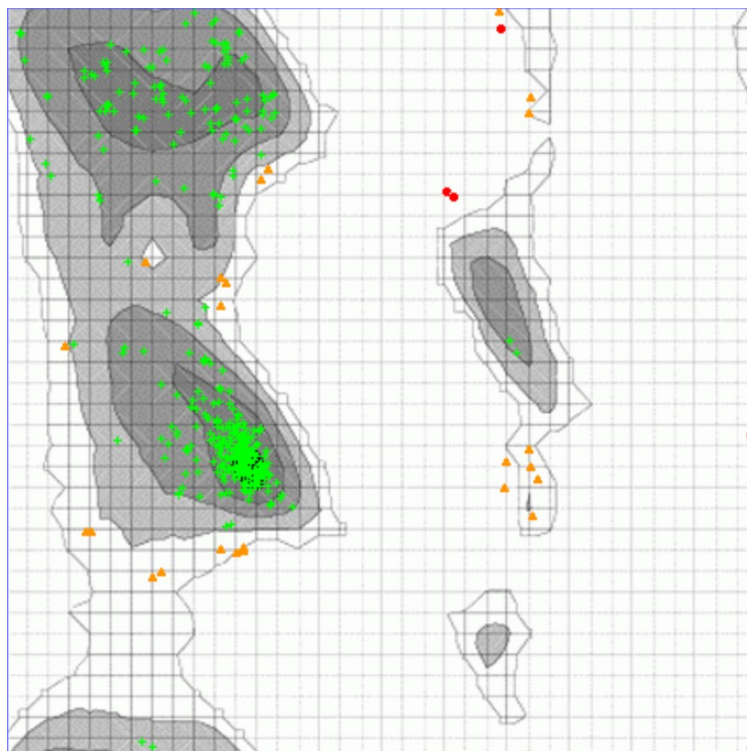
Figura 6 – Gráfico de Z-score para estruturas resolvidas de forma experimental, depositadas em bancos de dados públicos, em comparação com o comprimento de suas cadeias polipeptídicas, obtido na plataforma online ProSA Web. O ponto preto indica a localização do Z-score -7,64 conferido a estrutura do dímero de CgGSTO2.1.



Fonte: Próprio autor.

A disposição dos resíduos de uma proteína enovelada no meio é limitada pelas propriedades físico-químicas dos próprios resíduos e pelo confronto entre elas. Sendo assim, existe um número limitado de torções possíveis para o esqueleto carbônico da proteína. Com base na avaliação dos ângulos phi e psi de proteínas conhecidas, é possível estimar a estruturação de uma sequência de aminoácidos, ou avaliar a qualidade de um modelo 3D por meio do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963). Reforçando a validação do dímero, foi realizada uma análise das torções da estrutura dimérica por gráfico de Ramachandran na ferramenta online Ramachandran plot server, e os resultados obtidos demonstram que 98,8% dos ângulos do dímero estão dentro do permitido, e 1,2% em áreas questionáveis (Figura 7).

Figura 7 – Gráfico de Ramachandran (*Ramachandran plot server*) do dímero construído para CgGSTO2.1 por *docking* proteína-proteína. Regiões cinza escuro, cinza médio e cinza claro representam ângulos de torção altamente recomendados. Torções favoráveis e questionáveis são regiões brancas com quadriculado preto e quadriculado cinza, respectivamente. 93% dos ângulos de torção do dímero estão localizados em regiões altamente recomendadas (cruzes verdes), 5,8% localizados em regiões favoráveis (triângulos laranjas) e 1,2% em regiões questionáveis (pontos vermelhos).



Fonte: Próprio autor.

4.1.3 Docking molecular com pequenos ligantes

Uma vez que o modelo de CgGSTO2.1 foi construído, dimerizado e considerado adequado segundo as métricas empregadas, os testes de *docking* molecular com possíveis substratos puderam ser realizados. O *docking* molecular é uma poderosa ferramenta computacional de predição de interações entre ligante e enzima, uma vez que é capaz de estimar de forma acurada o encaixe do ligante no bolsão de ligação, a disposição espacial e valores de variação de energia livre (GEORGE PRIYA DOSS *et al.*, 2014). Diversos *softwares* com esta finalidade estão disponíveis, e cada um possui particularidades em relação a metodologia a ser empregada. O HADDOCK foi utilizado para gerar o dímero de nosso modelo por *docking* proteína-proteína, principalmente por sua capacidade de flexibilizar resíduos para melhor adequar às interações. No entanto, quando se trata de *docking* molecular com ligantes, não é

possível alterar o estado de protonação da cisteína, resíduo chave no que diz respeito à atividade GST ou DHAR da classe Ômega. Além disso, HADDOCK tem priorizado ensaios envolvendo SARS-CoV2, aumentando drasticamente o tempo para obtenção de resultados relacionados a outros assuntos. Sendo assim, optou-se pela utilização do *software* DockThor, que não possibilita a flexibilização de resíduos, porém, permite a modificação do estado de protonação de cisteínas.

Inicialmente, GSH, GDN e DHA foram submetidas a um teste de ligação sem delimitação de área na proteína, chamado de *blind docking*, com a finalidade de averiguar se o ligante seria capaz de encontrar o bolsão de ligação. De fato, algumas poses obtidas apresentaram ligação na cavidade, mas muitas outras se apresentaram ligação de forma inespecífica em regiões periféricas da proteína. Para validação do método e utilização como referência dos *dockings* subsequentes, com delimitação de área de ligação, *redockings* com modelos resolvidos experimentalmente foram realizados como controles positivos. A isoforma ômega humana 1.1 possui modelos disponíveis com os ligantes GSH (PDB 1EEM) e ácido ascórbico (PDB 3VLN). Não foi encontrado nenhum modelo para a mesma isoforma com o ligante CDNB ou GDN. Assim, o modelo mais próximo em identidade encontrado, para servir de referência ao *docking* com GDN, foi o de *Trametes versicolor* isoforma Ômega 3S (PDB 6F4F).

Os modelos de referência não apresentam dados de energia livre de ligação em suas publicações, e a maioria não possui mapa de interações 2D ligante-proteína demonstrando os resíduos ativos do bolsão de ligação. Em virtude disso, alguns mapas foram construídos no software PoseView utilizando a estrutura das referências publicadas no PDB com seus respectivos ligantes. Nenhum mapa desta categoria foi desenvolvido para os ensaios de *docking* molecular envolvendo a CgGSTO2.1.

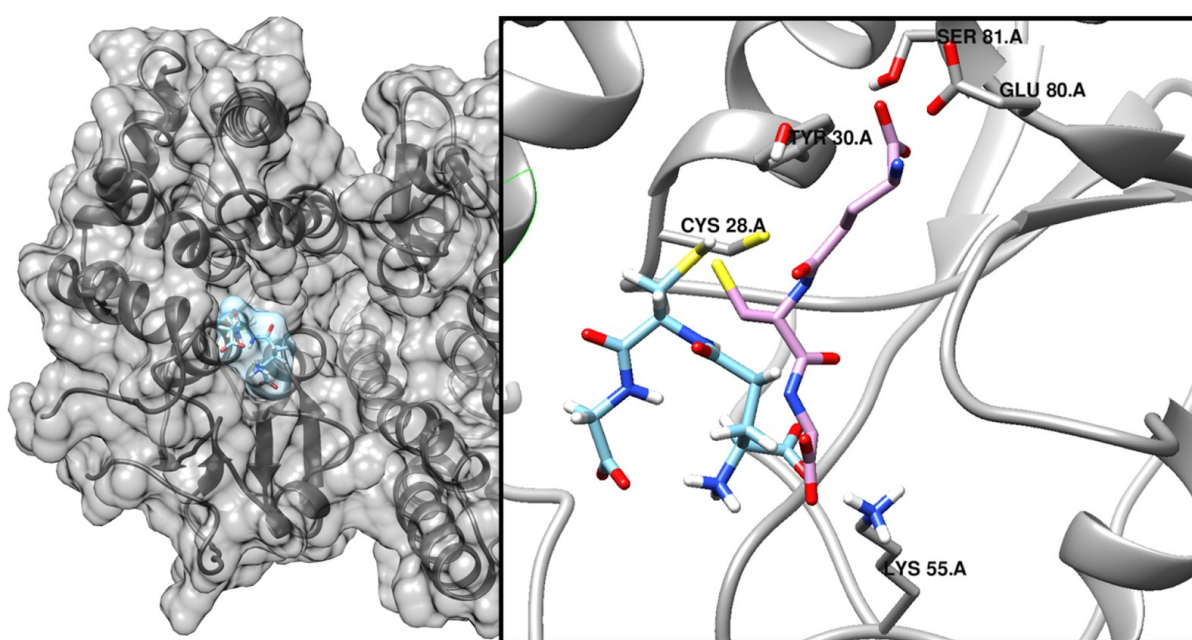
O ligante de cada referência foi salvo separadamente de seu modelo e utilizado no teste para a estimativa do ΔG da ligação. A caixa delimitante de ligação foi desenhada respeitando a acomodação de todos os resíduos do bolsão de ligação no interior, resultando em uma caixa de dimensões padrão utilizada para todos os ensaios. Com base nos dados disponíveis para os modelos referenciais, podemos perceber que apenas resíduos de um único monômero estão diretamente envolvidos na acomodação do composto no bolsão de ligação. Ainda assim, por se tratar de uma isoforma de ostra e potencialmente diferente das comparadas, a caixa foi mantida grande o suficiente para comportar resíduos de ambos os monômeros do dímero. A avaliação dos controles (*redocking*) foram feitas pelo menor RMSD da pose em relação ao próprio referencial. Os valores de ΔG obtidos para as poses escolhidas no *redocking* com menor RMSD

foram -7,18 kcal/mol para GSH, -7,74 kcal/mol para GDN e -6,09 kcal/mol para DHA. Sendo assim, esses valores foram usados como referência para indicar ligações de afinidade compatível com experimentos *in vitro*, pois são provenientes de dados cristalográficos.

Quando a GST ômega foi analisada, a pose selecionada para o *docking* com GSH no modelo de CgGSTO2.1 apresentou ΔG de -6,427 kcal/mol, similar ao obtido para o valor controle (*redocking*) do modelo de referência 1EEM (-7,18 kcal/mol), com RMSD de 6,857 Å (Figura 8).

Figura 8 – *Docking* molecular da CgGSTO2.1 com GSH . A esquerda, dímero e ligante com superfície semitransparente internalizado no bolsão de ligação. A direita, aproximação do bolsão de ligação com resíduos catalíticos demarcados. Em azul, a melhor pose do ligante GSH com energia livre de ligação estimada em -6,427 kcal/mol e RMSD 6,857 Å em relação à referência do modelo cristalográfico 1EEM (GSH rosa). Imagens geradas com programa

UCSF Chimera

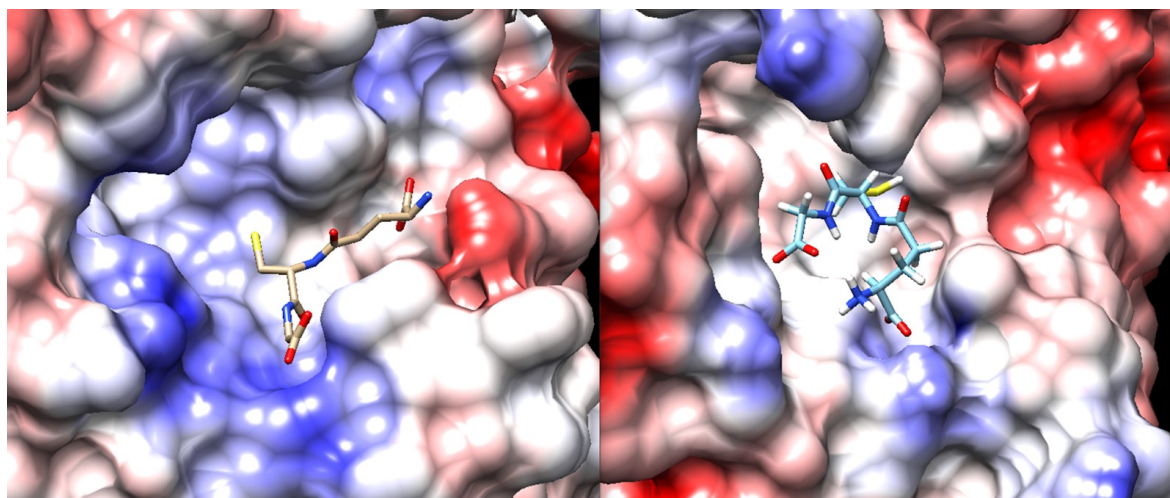


Fonte: Próprio autor.

A Cys28 do modelo foi mantida desprotonada com o intuito de potencializar sua interação com o grupo tiol da GSH, uma vez que ligações covalentes como as pontes dissulfeto não são simuladas pelas ferramentas de *Docking* molecular. Em sobreposição do resultado do *docking* com o ligante de referência, pode-se observar que ocupam uma região similar da cavidade de ligação, porém, com conformações diferentes, o que implica no alto valor de RMSD. Os resíduos glutamato e serina presentes no motivo $\beta\beta\alpha$ interagem e estabilizam a

porção gama-glutamil da GSH no sítio ativo, como pode ser observado no ligante de referência. Analisando a superfície dos modelos com os ligantes internalizados, nota-se que o espaço disponível em CgGSTO2.1 é bastante limitado em relação a 1EEM, e em virtude disso, os resíduos de glutamato e serina do motivo $\beta\beta\alpha$ se tornam inacessíveis para a pose de referência. Posicionar o ânion tiolato da GSH em interação com a cisteína do motivo $\beta\alpha\beta$ e a porção gama-glutamil da GSH com o glutamato e a serina do motivo $\beta\beta\alpha$ se torna incompatível espacialmente nas condições testadas (Figura 9). O mapa de interações dos resíduos com o ligante de 1EEM apontam interações da Lys59 e Val72, além da Cys32, Glu85 e Ser86 (BOARD *et al.*, 2000). A Lys59 possui interação com a porção glicinil da GSH. Em CgGSTO2.1, a Lys53 também aparece próxima ao ligante, sugerindo interação com a GSH do *docking*, porém, com o grupo carboxila da porção gama-glutamil.

Figura 9 – Comparação entre as cavidades de ligação dos modelos GSTO1.1 humana, PDB 1EEM (esquerda) e CgGSTO2.1 (direita) com coloração de potencial Coulombiano. No interior, a molécula de GSH.



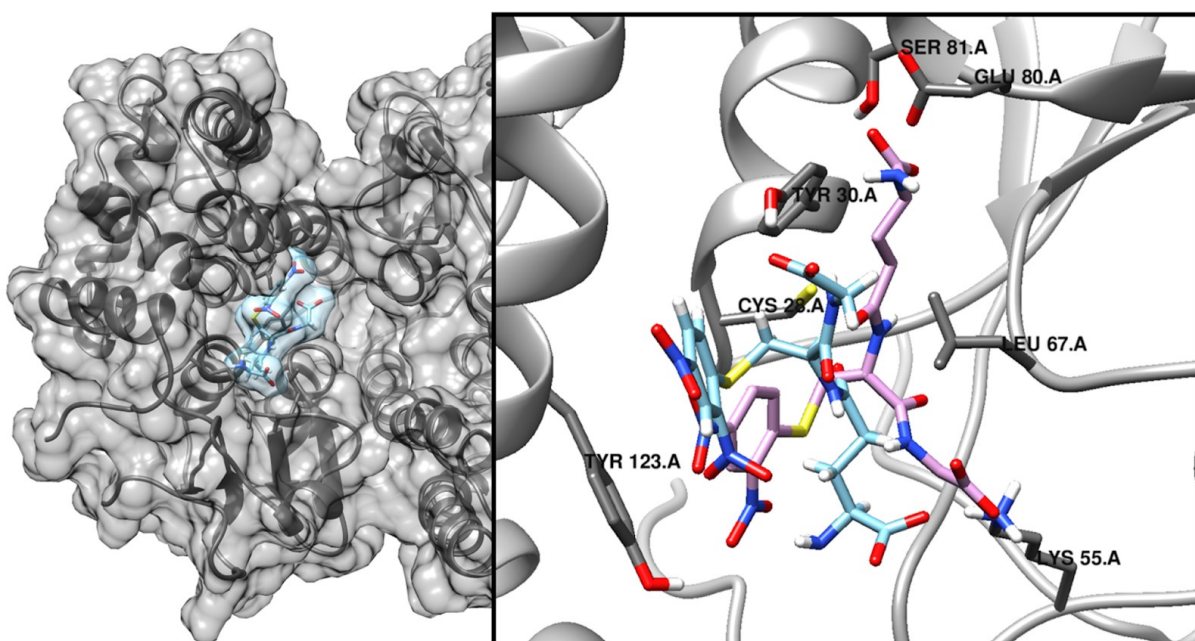
Fonte: o autor

A molécula de GDN é o resultado da conjugação entre glutatona e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno realizada pela enzima GST. Uma vez que a reação é iniciada após a ligação covalente por ponte dissulfeto entre a cisteína catalítica e a glutatona, partiu-se do princípio de que após a conjugação, a cisteína 28 estaria em estado desprotonado. Para tal, os resultados obtidos para o *docking* molecular com glutatona S-(2,4- dinitrobenzeno) foram parecidos com os obtidos para a molécula GSH. A pose selecionada ocupou um espaço similar dentro da cavidade e apresentou uma variação de energia livre de -7,097 kcal/mol, semelhante ao obtido

para o controle, o qual apresentou um valor de $-7,74$ kcal/mol. O valor de RMSD da sobreposição de ligantes foi de $6,747$ Å (Figura 10).

Não há dados sobre o mapa 2D de interações proteína-ligante disponíveis na publicação referente a estrutura 6F4F de *Trametes versicolor*, sendo assim, o mesmo foi gerado na ferramenta *online* PoseView, e os resíduos envolvidos na ligação são exatamente os mesmos para com a GSH. Nenhuma interação com a porção da molécula referente ao dinitrobenzeno foi identificada.

Figura 10 – *Docking* molecular da CgGSTO2.1 com GDN. A esquerda, dímero e ligante com superfície semi-transparente internalizado no bolsão de ligação. A direita, aproximação do bolsão de ligação com resíduos catalíticos demarcados. Em azul, a melhor pose do ligante GDN com energia livre de ligação estimada em $-7,097$ kcal/mol e RMSD $6,747$ Å em relação à referência do modelo cristalográfico PDB 6F4F (GDN rosa). Imagens geradas com o programa UCSF Chimera.

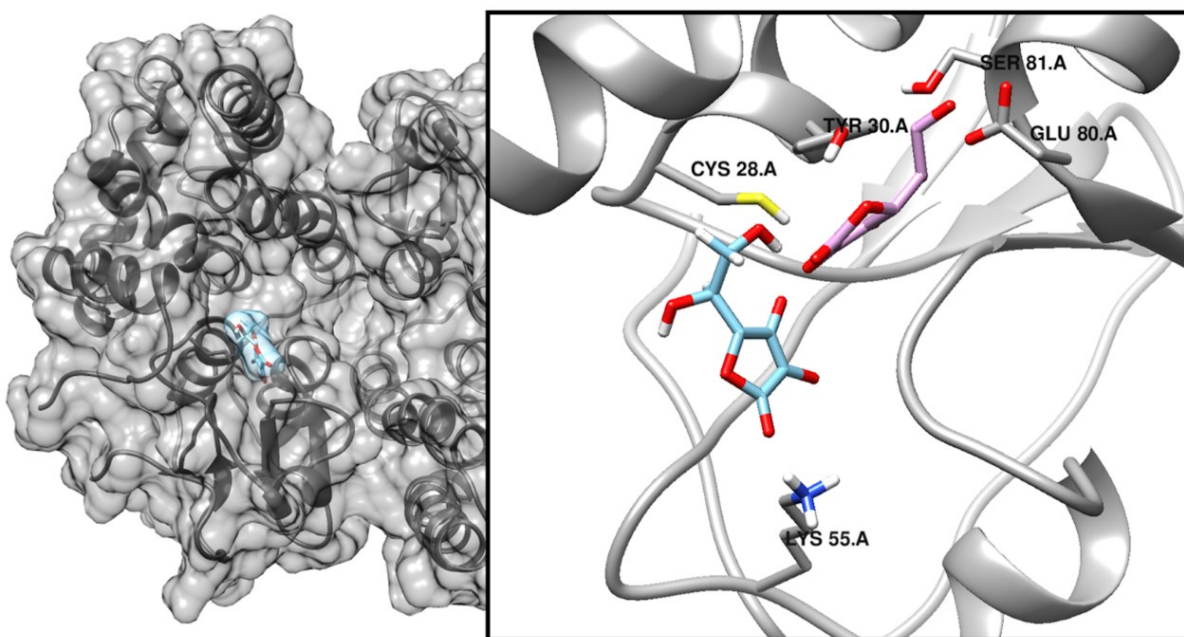


Fonte: Próprio autor.

A atividade dehidroascorbato redutase possui um mecanismo de reação diferente em comparação com a atividade glutiona s-transferase. A GSH atua como agente redutor doando prótons para regenerar a cisteína catalítica ou reduzir diretamente a molécula de dehidroascorbato, não realiza conjugação com o substrato (ZHOU *et al.*, 2012). O mapa de interações ligante-proteína 2D da estrutura 3VLN humana demonstra que os resíduos glutamato e serina do motivo $\beta\beta\alpha$ interagem e estabilizam a molécula de ácido ascórbico. O teste de

docking com o ligante DHA demonstra que a molécula adotou um posicionamento diferente da referência, onde possui maior proximidade com a cisteína catalítica do motivo $\beta\alpha\beta$. O valor de energia livre de ligação estimado para a pose foi de -6,696 kcal/mol, muito próximo ao -6,09 kcal/mol obtidos no *redocking* com o ácido ascórbico. O valor de RMSD da sobreposição dos ligantes foi de 6,708 Å (Figura 11).

Figura 11 – *Docking* molecular da CgGSTO2.1 com DHA. A esquerda, dímero e ligante com superfície semi-transparente internalizado no bolsão de ligação. A direita, aproximação do bolsão de ligação com resíduos catalíticos demarcados. Em azul, a melhor pose do ligante DHA com energia livre de ligação estimada em -6,696 kcal/mol e RMSD 6,708 Å em relação à referência do modelo cristalográfico PDB 3VLN (DHA rosa). Imagens geradas com o programa UCSF Chimera.



Fonte: Próprio autor.

A cisteína neste ensaio foi mantida em forma protonada, pois, é a principal responsável, segundo mecanismos propostos para a reação, em reduzir a molécula de dehidroascorbato em conjunto com a molécula de GSH. Para tanto, a proximidade do ligante com esse resíduo é esperada. Assim como demonstrado para a GSH, o bolsão de ligação na região referente ao glutamato e a serina no modelo de CgGSTO2.1 não possui acesso facilitado, dificultando o *docking* com DHA em uma posição parecida com a da referência. Ainda assim, é necessário considerar as particularidades de cada estrutura, e entender a possibilidade dos ligantes se comportarem de formas diferentes nos respectivos bolsões de ligação. Em resumo,

em relação aos ligantes conjugados testados, os dados sugerem maior interação para GDN comparado ao DHA. Os dados obtidos nos ensaios de *docking* e *redocking* estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 – Resumo dos ensaios de *docking* molecular.

Ligante	PDB referência	<i>Redocking</i> controle ΔG (kcal/mol)	Afinidade CgGSTO2.1 ΔG (kcal/mol)	RMSD entre ligantes (Å)
GSH	1EEM	-7,18	-6,427	6,857
GDN	6F4F	-7,74	-7,097	6,747
DHA	3VLN	-6,09	-6,696	6,708

Fonte: Próprio autor.

4.2 ANÁLISES *IN VITRO*

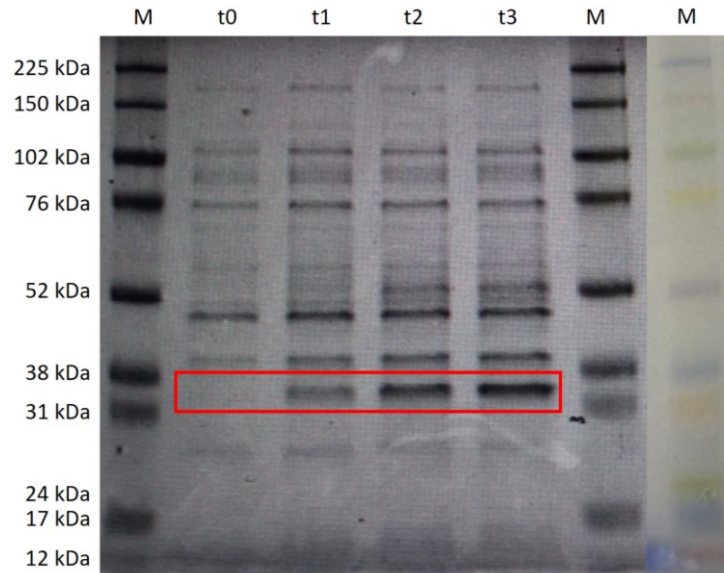
4.2.1 Transformação e purificação da proteína

Apesar de as técnicas de expressão heteróloga estarem bastante difundidas, a produção de proteínas recombinantes é um processo complexo, devido aos inúmeros fatores que alteram a estabilidade e o enovelamento de uma proteína. Cada proteína, mesmo que homóloga a outra, possui suas próprias características provenientes de sua sequência ou sua conformação no meio em que está inserida. Isso a torna única e seu comportamento em solução é de difícil previsão. Ferramentas como o ProtParam fornecem indícios das condições necessárias para lidar com a proteína analisada em solução.

UFCs resistentes à ampicilina e cloranfenicol de cepas BL21 transformadas contendo o gene sintético de CgGSTO2.1 incorporado no vetor pET19b, foram obtidas. Após os testes de concentração de IPTG e tempo de expressão realizados. Foi definido que a melhor condição de expressão era de 1 mM final de IPTG para indução, com tempo de incubação em agitação por 3h a 37° C. O conteúdo de proteína aumentando em função do tempo após a adição de IPTG ao meio, na faixa de peso molecular adequado, pode ser observado na figura 12.

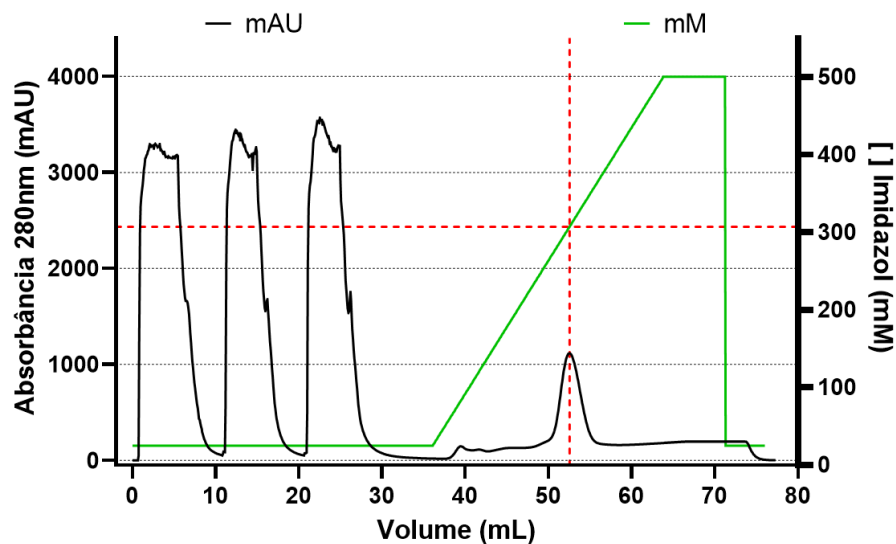
Confirmada a produção da proteína recombinante, o lisado centrifugado da colônia foi analisado em frações diferentes, sobrenadante e precipitado, por SDS-PAGE. A maior concentração da proteína recombinante se encontrava no sobrenadante, indicando expressão solúvel. Uma primeira purificação foi realizada, e com a finalidade de favorecer o teste de atividade GST da proteína recombinante segundo Habig (1974), o tampão utilizado no processo foi 50 mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM imidazol e 15% glicerol. A proteína foi eluída com concentração aproximada de 300 mM de imidazol no sistema AKTA (Figura 13).

Figura 12 – Perfil proteico durante a expressão do gene CgGSTO2.1 com 1 mM final de IPTG em até 3h de incubação. Amostras coletadas a cada hora a partir do início da indução por IPTG (t0, t1, t2 e t3) flanqueadas por marcadores de peso molecular (M). Quadro vermelho indica a localização da proteína no gel segundo seu peso molecular (~30 kDa), aumentando a concentração em função do tempo. O perfil proteico foi visualizado em SDS-PAGE 12%.



Fonte: Próprio autor.

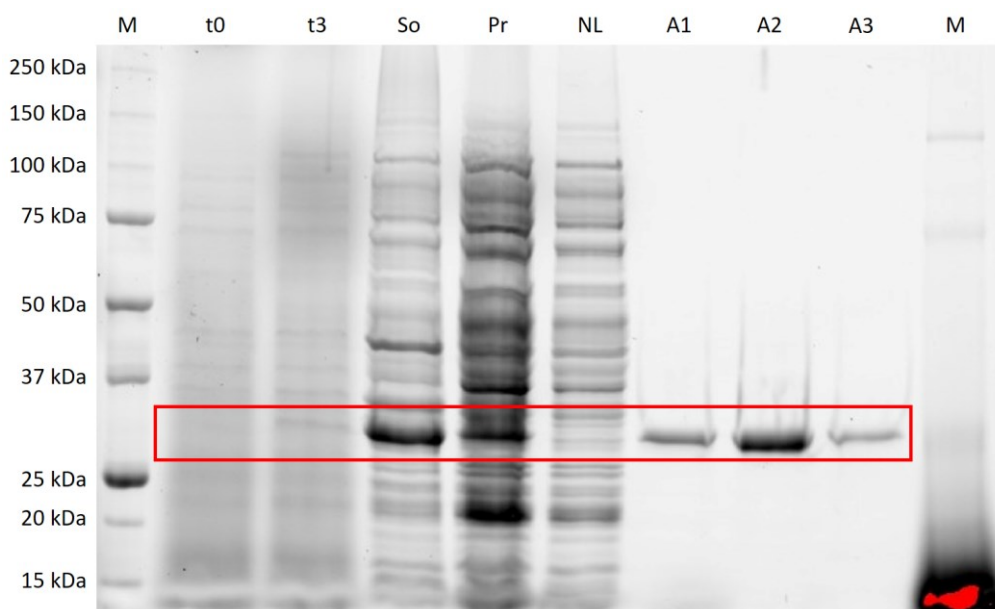
Figura 13 – Cromatograma de purificação da proteína rGSTO2.1 em FPLC por cromatografia de afinidade. Processo realizado com três injeções de amostra no sistema, tendo o pico de eluição da proteína (tracejado vermelho vertical) em concentração aproximada de 300 mM de imidazol (tracejado vermelho horizontal). Linhas preta e verde se referem à absorbância das proteínas presentes no tampão ao passar pela coluna *histrap* e concentração de imidazol no sistema de purificação, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

A análise do conteúdo proteico dos picos do cromatograma mostra que a proteína foi removida na coluna de afinidade por histidina, e só foi liberada após o aumento da concentração de imidazol com pureza acima de 95% (Figura 14).

Figura 14 – SDS-PAGE de expressão e purificação da proteína rGSTO2.1. Nas extremidades, marcadores de peso molecular (M); tempos 0 e 3 horas de expressão (t0 e t3); sobrenadante (So) e precipitado (Pr) provenientes da lise e centrifugação; fração não ligante a coluna de *hisrap* (NL) e frações referentes ao maior pico de absorvância da eluição (A1, A2 e A3). Quadro vermelho indica a migração da proteína recombinante no gel de acordo com o peso molecular.



Fonte: Próprio autor.

O pico referente à eluição da proteína foi fracionado em duas alíquotas e apresentaram aproximadamente 1 e 0,6 mg/ml de concentração, segundo quantificação pelo método de Bradford. A primeira alíquota, de maior concentração de rCgGSTO2.1, foi submetida ao processo de diálise, nas mesmas condições da purificação, porém sem o imidazol. Na primeira etapa da diálise no tampão citado, a proteína apareceu precipitada. Situação confirmada por centrifugação e aparecimento de precipitado ao fundo do tubo e quantificação por Bradford da amostra igual ao branco da reação. A segunda metade foi submetida a um tampão com maior quantidade de glicerol (30%) e com adição de agente redutor, ditioneitol 0,5 mM, e dialisada nas mesmas condições, apresentando precipitação na segunda etapa da diálise, também confirmada por centrifugação e quantificação. Uma segunda purificação foi realizada nas condições citadas na metodologia, e a fração referente ao pico foi imediatamente suplementada com um tampão de estabilização, condição adaptada do protocolo sugerido por (ZHOU *et al.*,

2012), onde as concentrações de reagentes do tampão de purificação foram mantidas, porém, com adição de 500 mM final de arginina. A diálise da nova amostra ocorreu sem precipitação aparente, no entanto, possivelmente muita proteína foi perdida no processo, e a quantificação foi impossibilitada, uma vez que a amostra se encontrava fora da curva padrão (0,5 a 0,05 mM de padrão proteico), aparentemente um pouco abaixo do menor ponto. A proteína purificada e dialisada foi concentrada em tubo concentrador, resultando em aproximadamente 50 µl a 0,8 mg/ml. Esta amostra foi utilizada para os testes de atividade com CDNB e DHA.

4.2.2 Teste de atividade

Em função da pequena quantidade de amostra obtida para os testes de atividade, não foi possível realizar a determinação do K_m e k_{cat} para os substratos de GST testados neste trabalho. Apenas um único teste, em duplicata, foi realizado para cada substrato em concentrações fixas. A partir dos valores obtidos de velocidade máxima por comprimento do poço, provenientes da reação de conjugação GST + CDNB, obtidos pela divisão da taxa de incremento de absorbância a 360 nm pelo comprimento do poço, foi calculada a atividade GST de 19,286 mU/mg proteína rCgGSTO2.1 (tabela 3). Não foi possível realizar o mesmo cálculo de atividade para o substrato DHA, uma vez que a duplicata referente à enzima teve taxa de incremento de absorbância menor que a do branco da reação. Até o momento conclui-se que a atividade da CgGSTO com o substrato CDNB se mostra mais promissora quando comparada com o substrato DHA.

Tabela 3 – Valores obtidos para o teste de atividade com CDNB e DHA para volume fixo de proteína purificada rCgGSTO2.1 0,8 mg/ml.

	Branco	rCgGSTO2.1	rCgGSTO - Branco	Atividade (mU/mg proteína)
CDNB	16,688	23,741	7,053	19,286
DHA	20,756	19,801	-0,955	X

Fonte: Próprio autor.

As sequências de aminoácidos das GST são diferentes entre si, preservando majoritariamente a estrutura. Não há muitos dados disponíveis na literatura de estruturas de GST da classe ômega, interagindo com substratos, resolvidas experimentalmente. Os dados gerados neste trabalho por bioinformática foram baseados nas poucas referências de estruturas de GST ômega de espécies muito distintas evolutivamente da ostra do pacífico, uma vez que

não existem dados desta categoria para moluscos. A atividade DHAR em plantas é amplamente documentada, uma vez que o aumento na atividade dessas enzimas pode aumentar a biomassa dos vegetais (KIM *et al.*, 2013) e melhorar a sobrevivência da produção (YOSHIDA *et al.*, 2006). Ainda assim, nossas buscas por identidade no PDB não revelaram enzimas similares com potencial ligação ao DHA. Em virtude disso, a maior parte da base para discussão sobre a possível atividade do ômega de ostra do pacífico foi em relação a ômega 1.1 devido a maior similaridade entre sequências e disponibilidade de dados experimentais. A GST ômega humana 2.2 compartilha de uma estrutura muito similar a 1.1, apresentando RMSD de 0,934 Å, apesar da identidade entre sequências ser de 65,5%. Ainda que muito parecidas, essa diferença é capaz de garantir atividade DHAR para a isoforma 2.2 em 100 vezes maior quando comparada com a ômega humana 1.1 (SCHMUCK *et al.*, 2005). Analisando as diferenças apresentadas pelo trabalho citado em relação às isoformas ômega humanas, CgGSTO2.1 não possui nenhuma das alterações que possivelmente aumentam a atividade DHAR da isoforma 2.2, e nem as preservadas pela 1.1, possivelmente por se encontrarem na região C-terminal das enzimas, região de menor identidade entre as sequências. Uma vez que nesse contexto as isoformas são muito diferentes entre si e de acordo com as predições *in silico* nas condições realizadas por esse trabalho, a ausência de atividade com o substrato DHA é um resultado esperado. Ainda que rCgGSTO2.1 tenha apresentado atividade aparente com CDNB, mais testes necessitam ser realizados para garantir que o que está sendo observado não se trata de um artefato. Testes sem GSH, com mais réplicas e novas condições de purificação podem elucidar as preferências da GST ômega de *Crassostrea gigas* e melhor caracterizar sua atividade catalítica.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A sequência obtida para CgGSTO2.1, quando alinhada com outras sequências homólogas provenientes de outras espécies, apresenta identidade conservada, principalmente em regiões de importância estrutural e funcional, como os motivos $\beta\alpha\beta$ e $\beta\beta\alpha$, mantendo os mesmos resíduos catalíticos para esta isoforma.

O enovelamento do modelo apresenta estrutura canônica esperada para uma enzima da classe ômega de GST, possuindo poucos desvios em comparação com o modelo da GST ômega humana, e o dímero construído foi considerado adequado de acordo com as métricas utilizadas.

O *docking* molecular com GSH permitiu a confirmação de afinidade deste substrato pelo bolsão de ligação estimado para o modelo e pelos resíduos internos a este espaço, corroborando com a hipótese de que a sequência analisada se trata de fato de uma proteína que pode utilizar GSH em suas reações.

O *docking* molecular com os substratos GDN e DHA apresentaram resultados muito similares aos obtidos para a glutathione, e seus valores de energia livre de Gibbs se aproximaram em muito aos obtidos pelo *redocking* de seus respectivos substratos de referência. No entanto, o RMSD ficou muito distante do aceitável, indicando uma localização distinta do substrato dentro do bolsão de ligação. Novos *dockings* moleculares devem ser realizados, com flexibilização dos resíduos internos, para uma melhor estimativa de posição e afinidade da proteína por estes substratos.

A purificação da proteína recombinante foi realizada com êxito, e apresentou pureza acima de 95%. O protocolo utilizado para estabilizar a proteína e evitar a precipitação, conseguiu melhorar sua solubilidade no meio, no entanto, ainda não foi suficiente para evitar muitas perdas durante o processo de diálise.

O teste de atividade não apresentou dados suficientes para gerar uma curva de atividade, ou estimar o K_m/k_{cat} , devido à pouca disponibilidade de proteína dialisada e concentrada. Apesar do tampão de estabilização ter evitado a precipitação da proteína em solução, pode ter interferido nos testes de atividade. Novas composições de tampão de diálise precisam ser testadas, para que uma maior quantidade de proteína purificada seja obtida e a atividade catalítica desta enzima possa ser melhor caracterizada.

A instabilidade da proteína recombinante, e a necessidade de maiores concentrações de reagentes no tampão para evitar a precipitação, possivelmente está associada à presença do resíduo Cys165. Um novo plasmídeo construído com uma substituição deste resíduo pode

aumentar a estabilidade da proteína em solução, melhorando as condições para testes de atividade catalítica.

REFERÊNCIAS

AMORIM, Leiliane Coelho André. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158–170, jun. 2003.

ANDERSON, Robert J.; WENG, Zhiping; CAMPBELL, Robert K.; JIANG, Xuliang. Main-chain conformational tendencies of amino acids. **Proteins**, v. 60, n. 4, p. 679–689, 1 set. 2005.

AWASTHI, Yogesh C. **Toxicology of Glutathione Transferases**. [S. l.]: CRC Press, 2006. DOI 10.1201/9781420004489.

BELIAEFF, Benoit; BURGEOT, Thierry. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316–1322, 2002. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>.

BERMAN, Helen M.; WESTBROOK, John; FENG, Zukang; GILLILAND, Gary; BHAT, T. N.; WEISSIG, Helge; SHINDYALOV, Ilya N.; BOURNE, Philip E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.

BETANCOURT, M. R.; SKOLNICK, J. Universal similarity measure for comparing protein structures. **Biopolymers**, v. 59, n. 5, p. 305–309, 15 out. 2001. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(20011015\)59:5<305::AID-BIP1027>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0282(20011015)59:5<305::AID-BIP1027>3.0.CO;2-6).

BOARD, Philip G. The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, n. 2, p. 226–235, 1 maio 2011. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.561353>.

BOARD, Philip G.; COGGAN, Marjorie; CHELVANAYAGAM, Gareth; EASTEAL, Simon; JERMIIN, Lars S.; SCHULTE, Gayle K.; DANLEY, Dennis E.; HOTH, Lise R.; GRIFFOR, Matthew C.; KAMATH, Ajith V.; ROSNER, Michele H.; CHRUNYK, Boris A.; PERREGAUX, David E.; GABEL, Christopher A.; GEOGHEGAN, Kieran F.; PANDIT, Jayvardhan. Identification, Characterization, and Crystal Structure of the Omega Class

Glutathione Transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, p. 24798–24806, 8 nov. 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001706200>.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. **Marine Biology**, v. 146, n. 1, p. 53–64, 1 dez. 2004. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1423-6>.

BOUTET, Isabelle; TANGUY, Arnaud; MORAGA, Dario. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p. 147–157, 31 mar. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.12.027>.

CAMACHO, Christiam; COULOURIS, George; AVAGYAN, Vahram; MA, Ning; PAPADOPOULOS, Jason; BEALER, Kevin; MADDEN, Thomas L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 421, 15 dez. 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.

CROOM, Edward. Chapter Three - Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. *In*: HODGSON, Ernest (org.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science. Toxicology and Human Environments**. [S. l.]: Academic Press, 2012. v. 112, p. 31–88. DOI 10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9.

DE VRIES, Sjoerd J.; VAN DIJK, Marc; BONVIN, Alexandre M. J. J. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. **Nature Protocols**, v. 5, n. 5, p. 883–897, maio 2010. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.32>.

DECONTO, Vanessa Schadeck. **Prevalência das isoformas de Glutathione S-transferase em diferentes tecidos de ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)**. 2019. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

DUMBAULD, Brett R.; RUESINK, Jennifer L.; RUMRILL, Steven S. The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. **Aquaculture**, v. 290, n. 3, p. 196–223, 19 maio 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.033>.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

FABRINI, Raffaele; DE LUCA, Anastasia; STELLA, Lorenzo; MEI, Giampiero; ORIONI, Barbara; CICCONE, Sarah; FEDERICI, Giorgio; LO BELLO, Mario; RICCI, Giorgio. Monomer–Dimer Equilibrium in Glutathione Transferases: A Critical Re-Examination. **Biochemistry**, v. 48, n. 43, p. 10473–10482, 3 nov. 2009. <https://doi.org/10.1021/bi901238t>.

FAO. **Cultured Aquatic Species Information Programme. Crassostrea gigas**. Rome: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018.

FOWLER, Bruce A. Molecular biomarkers: Challenges and prospects for the future. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Molecular Biomarkers - 21st Century Tools for 21st Century Problems in Toxicology. v. 206, n. 2, p. 97, 7 ago. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.013>.

FROGER, Alexandrine; HALL, James E. Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 6, 1 ago. 2007. DOI 10.3791/253. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2557105/>.

GASTEIGER, Elisabeth; HOOGLAND, Christine; GATTIKER, Alexandre; DUVAUD, S'everine; WILKINS, Marc R.; APPEL, Ron D.; BAIROCH, Amos. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *In*: WALKER, John M. (org.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607. DOI 10.1385/1-59259-890-0:571.

GEORGE PRIYA DOSS, C.; CHAKRABORTY, Chiranjib; NARAYAN, Vaishnavi; THIRUMAL KUMAR, D. Computational approaches and resources in single amino acid substitutions analysis toward clinical research. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 94, p. 365–423, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800168-4.00010-X>.

GILMAN, a. g. **Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamerica, 1996.

GIRARDINI, Javier; AMIRANTE, Alejandro; ZEMZOUMI, Khalid; SERRA, Esteban. Characterization of an omega-class glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* with glutaredoxin-like dehydroascorbate reductase and thiol transferase activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 22, p. 5512–5521, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03254.x>.

GUEDES, Isabella A.; COSTA, Leon S. C.; DOS SANTOS, Karina B.; KARL, Ana L. M.; ROCHA, Gregório K.; TEIXEIRA, Iury M.; GALHEIGO, Marcelo M.; MEDEIROS, Vivian; KREMPSER, Eduardo; CUSTÓDIO, Fábio L.; BARBOSA, Helio J. C.; NICOLÁS, Marisa F.; DARDENNE, Laurent E. Drug design and repurposing with DockThor-VS web server focusing on SARS-CoV-2 therapeutic targets and their non-synonym variants. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 5543, 10 mar. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84700-0>.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering**, v. 4, n. 2, p. 155–161, dez. 1990.

HABIG, William H.; PABST, Michael J.; JAKOBY, William B. Glutathione S-Transferases THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 25 nov. 1974.

HALPERN, Benjamin S.; FRAZIER, Melanie; POTAPENKO, John; CASEY, Kenneth S.; KOENIG, Kellee; LONGO, Catherine; LOWNDES, Julia Stewart; ROCKWOOD, R. Cotton; SELIG, Elizabeth R.; SELKOE, Kimberly A.; WALBRIDGE, Shaun. Spatial and temporal changes in cumulative human impacts on the world's ocean. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 14 jul. 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms8615>.

HALPERN, Benjamin S.; WALBRIDGE, Shaun; SELKOE, Kimberly A.; KAPPEL, Carrie V.; MICHELI, Fiorenza; D'AGROSA, Caterina; BRUNO, John F.; CASEY, Kenneth S.; EBERT, Colin; FOX, Helen E.; FUJITA, Rod; HEINEMANN, Dennis; LENIHAN, Hunter S.; MADIN, Elizabeth M. P.; PERRY, Matthew T.; SELIG, Elizabeth R.; SPALDING, Mark; STENECK,

Robert; WATSON, Reg. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 948–952, 15 fev. 2008. <https://doi.org/10.1126/science.1149345>.

HAYES, John D.; FLANAGAN, Jack U.; JOWSEY, Ian R. Glutathione Transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51–88, 2005. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.

ICARUS ALLEN, J.; MOORE, Michael N. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? **Marine Environmental Research**, Twelfth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms. v. 58, n. 2, p. 227–232, 1 ago. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.119>.

KIM, Young-Saeng; KIM, Il-Sup; BAE, Mi-Jung; CHOE, Yong-Hoe; KIM, Yul-Ho; PARK, Hyang-Mi; KANG, Hong-Gyu; YOON, Ho-Sung. Homologous expression of cytosolic dehydroascorbate reductase increases grain yield and biomass under paddy field conditions in transgenic rice (*Oryza sativa* L. japonica). **Planta**, v. 237, n. 6, p. 1613–1625, jun. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1862-8>.

KRAUTH-SIEGEL, R. Luise; ARSCOTT, L. David; SCHÖNLEBEN-JANAS, Annette; SCHIRMER, R. Heiner; WILLIAMS, Charles H. Role of Active Site Tyrosine Residues in Catalysis by Human Glutathione Reductase. **Biochemistry**, v. 37, n. 40, p. 13968–13977, 1 out. 1998. <https://doi.org/10.1021/bi980637j>.

LIMA, Daína; MATTOS, Jacó J.; PIAZZA, Rômi S.; RIGHETTI, Bárbara Pacheco Harrison; MONTEIRO, Jhonatas S.; GROTT, Suelen Cristina; ALVES, Thiago Caique; TANIGUCHI, Satie; BÍCEGO, Márcia Caruso; DE ALMEIDA, Eduardo Alves; BEBIANNO, Maria J.; MEDEIROS, Igor D.; BAINY, Afonso C. D. Stress responses in *Crassostrea gasar* exposed to combined effects of acute pH changes and phenanthrene. **Science of The Total Environment**, v. 678, p. 585–593, 15 ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.450>.

LIMA, Daína; ZACCHI, Flávia Lucena; MATTOS, Jacó Joaquim; FLORES-NUNES, Fabrício; GOMES, Carlos Henrique Araújo de Miranda; DE MELLO, Álvaro Cavaler Pessoa; SIEBERT, Marília Nardelli; PIAZZA, Clei Endrigo; TANIGUCHI, Satie; SASAKI, Silvio Tarou; BÍCEGO, Márcia Caruso; BEBIANNO, Maria João; DE ALMEIDA, Eduardo Alves; BAINY, Afonso Celso Dias. Molecular and cellular effects of temperature in oysters

Crassostrea brasiliana exposed to phenanthrene. **Chemosphere**, v. 209, p. 307–318, 1 out. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.094>.

LUNA-ACOSTA, A.; KANAN, R.; LE FLOCH, S.; HUET, V.; PINEAU, P.; BUSTAMANTE, P.; THOMAS-GUYON, H. Enhanced immunological and detoxification responses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to chemically dispersed oil. **Water Research**, v. 45, n. 14, p. 4103–4118, 1 ago. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.011>.

MAITI, Rajarshi; VAN DOMSELAAR, Gary H.; ZHANG, Haiyan; WISHART, David S. SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server issue, p. W590–W594, 1 jul. 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh477>.

MARTINS, José Carlos; CAMPOS, Alexandre; OSÓRIO, Hugo; DA FONSECA, Rute; VASCONCELOS, Vítor. Proteomic Profiling of Cytosolic Glutathione Transferases from Three Bivalve Species: *Corbicula fluminea*, *Mytilus galloprovincialis* and *Anodonta cygnea*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 1887–1900, 27 jan. 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms15021887>.

MFEKA, Mbalenhle Sizamile; MARTÍNEZ-OYANEDEL, José; CHEN, Wanping; ACHILONU, Ikechukwu; SYED, Khajamohiddin; KHOZA, Thandeka. Comparative analyses and structural insights of new class glutathione transferases in *Cryptosporidium* species. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 20370, 23 nov. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77233-5>.

MOORE, Michael N; DEPLEDGE, Michael H; READMAN, James W; PAUL LEONARD, D. R. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Genotoxicological Studies in Aquatic Organisms. v. 552, n. 1, p. 247–268, 18 ago. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.028>.

NEUMANN, Barbara; VAFEIDIS, Athanasios T.; ZIMMERMANN, Juliane; NICHOLLS, Robert J. Future Coastal Population Growth and Exposure to Sea-Level Rise and Coastal

Flooding - A Global Assessment. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0118571, 11 mar. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118571>.

NIYOGI, S; BISWAS, S; SARKER, S; DATTA, A. G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v. 52, n. 1, p. 13–26, 1 jul. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00257-9](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00257-9).

NOGUEIRA, Diego J.; MATTOS, Jacó J.; DYBAS, Patrick R.; FLORES-NUNES, Fabricio; SASAKI, Silvio Tarou; TANIGUCHI, Satie; SCHMIDT, Éder C.; BOUZON, Zenilda L.; BÍCEGO, Márcia C.; MELO, Claudio M. R.; TOLEDO-SILVA, Guilherme; BAINY, Afonso C. D. Effects of phenanthrene on early development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789). **Aquatic Toxicology**, v. 191, p. 50–61, 1 out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.07.022>.

PATSKOVSKY, Yury V.; PATSKOVSKA, Larysa N.; LISTOWSKY, Irving. The Enhanced Affinity for Thiolate Anion and Activation of Enzyme-bound Glutathione Is Governed by an Arginine Residue of Human Mu Class Glutathione S-Transferases *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 5, p. 3296–3304, 4 fev. 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3296>.

PEMBLE, S E; WARDLE, A F; TAYLOR, J B. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. **Biochemical Journal**, v. 319, n. Pt 3, p. 749–754, 1 nov. 1996. .

PETTERSEN, Eric F.; GODDARD, Thomas D.; HUANG, Conrad C.; COUCH, Gregory S.; GREENBLATT, Daniel M.; MENG, Elaine C.; FERRIN, Thomas E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, p. 95–99, jul. 1963. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(63)80023-6).

RAND, Gary M. **Fundamentals Of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment**. 2. ed. [S. l.]: CRC Press, 1995.

REMENTERIA, Ane; MIKOLACZYK, Mathilde; PEÑA, Ainhize; LANCELEUR, Laurent; BLANC, Gérard; SOTO, Manu; SCHÄFER, Jörg; ZALDIBAR, Beñat. Assessment of health status of oysters (*Crassostrea gigas*) exposed to environmentally relevant concentrations of Ag and Cu in brackish waters. **Journal of Sea Research**, Changing Ecosystems in the Bay of Biscay: Natural and Anthropogenic Effects. v. 130, p. 229–238, 1 dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.04.013>.

RESENDE, Mário Lúcio V.; SALGADO, Sônia M. L.; CHAVES, Zuleide M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123–130, abr. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000200001>.

RODRÍGUEZ-ORTEGA, Manuel J.; ALHAMA, José; FUNES, Victoria; ROMERO-RUIZ, Antonio; RODRÍGUEZ-ARIZA, Antonio; LÓPEZ-BAREA, Juan. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from South-Spanish littoral. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 542–549, 2002. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210311>.

ROUIMI, P; ANGLADE, P; BENZEKRI, A; COSTET, P; DEBRAUWER, L; PINEAU, T; TULLIEZ, J. Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts. **Biochemical Journal**, v. 358, n. Pt 1, p. 257–262, 15 ago. 2001. .

SACCO, James C. **Phase II biotransformation of xenobiotics in polar bear (*Ursus maritimus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*)**. 2006. Tese de Doutorado – University of Florida, Florida, 2006.

SATOH, Takumi; MCKERCHER, Scott R.; LIPTON, Stuart A. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 645–657, 1 dez. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.022>.

SCHMUCK, Erica M.; BOARD, Philip G.; WHITBREAD, Astrid K.; TETLOW, Natasha; CAVANAUGH, Juleen A.; BLACKBURN, Anneke C.; MASOUMI, Amir. Characterization

of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 15, n. 7, p. 493–501, jul. 2005. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000165725.81559.e3>.

SEKOVSKI, Ivan; NEWTON, Alice; DENNISON, William C. Megacities in the coastal zone: Using a driver-pressure-state-impact-response framework to address complex environmental problems. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 96, p. 48–59, 1 jan. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.07.011>.

SHEEHAN, D; MEADE, G; FOLEY, V M; DOWD, C A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. Pt 1, p. 1–16, 15 nov. 2001. .

SORANZO, N.; SARI GORLA, M.; MIZZI, L.; DE TOMA, G.; FROVA, C. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 271, n. 5, p. 511–521, 1 jun. 2004. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1006-8>.

TENG, Jia; ZHAO, Jianmin; ZHU, Xiaopeng; SHAN, Encui; WANG, Qing. Oxidative stress biomarkers, physiological responses and proteomic profiling in oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to microplastics with irregular-shaped PE and PET microplastic. **Science of The Total Environment**, v. 786, p. 147425, 10 set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147425>.

VUILLEUMIER, S.; PAGNI, M. The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 138–146, fev. 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0836-0>.

WANG, Xiaotong; XU, Wenjie; WEI, Lei; ZHU, Chenglong; HE, Cheng; SONG, Hongce; CAI, Zhongqiang; YU, Wenchao; JIANG, Qiuyun; LI, Lingling; WANG, Kun; FENG, Chenguang. Nanopore Sequencing and De Novo Assembly of a Black-Shelled Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Genome. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 1211, 2019. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01211>.

WATERHOUSE, Andrew M.; PROCTER, James B.; MARTIN, David M. A.; CLAMP, Michèle; BARTON, Geoffrey J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 1 maio 2009. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.

WHITBREAD, Astrid K.; MASOUMI, Amir; TETLOW, Natasha; SCHMUCK, Erica; COGGAN, Marjorie; BOARD, Philip G. Characterization of the Omega Class of Glutathione Transferases. *In*: SIES, Helmut; PACKER, Lester (orgs.). **Methods in Enzymology**. Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases. [S. l.]: Academic Press, 2005. v. 401, p. 78–99. DOI 10.1016/S0076-6879(05)01005-0.

WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_2, p. W407–W410, 1 jul. 2007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.

WILCE, Matthew C. J.; PARKER, Michael W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1205, n. 1, p. 1–18, 16 mar. 1994. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90086-8).

WOOLFSON, D. N.; WILLIAMS, D. H. The influence of proline residues on alpha-helical structure. **FEBS letters**, v. 277, n. 1–2, p. 185–188, 17 dez. 1990. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80839-b](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80839-b).

WORLDOMETER. Worldometer - real time world statistics. 2022. Disponível em: <http://www.worldometers.info/>. Acesso em: 3 fev. 2022.

YAMAMOTO, Kohji; SUZUKI, Mamoru; HIGASHIURA, Akifumi; NAKAGAWA, Atsushi. Three-dimensional structure of a Bombyx mori Omega-class glutathione transferase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 438, n. 4, p. 588–593, 6 set. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.011>.

YOSHIDA, Seiji; TAMAOKI, Masanori; SHIKANO, Takeshi; NAKAJIMA, Nobuyoshi; OGAWA, Daisuke; IOKI, Motohide; AONO, Mitsuko; KUBO, Akihiro; KAMADA, Hiroshi; INOUE, Yasunori; SAJI, Hikaru. Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone

tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant & Cell Physiology**, v. 47, n. 2, p. 304–308, fev. 2006. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci246>.

ZACCHI, Flávia Lucena; DE LIMA, Daína; FLORES-NUNES, Fabrício; MATTOS, Jacó Joaquim; LÜCHMANN, Karim Hahn; DE MIRANDA GOMES, Carlos Henrique Araújo; BÍCEGO, Márcia Caruso; TANIGUCHI, Satie; SASAKI, Silvio Tarou; DIAS BAINY, Afonso Celso. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliensis* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, v. 183, p. 94–103, 1 fev. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.016>.

ZACCHI, Flávia Lucena; FLORES-NUNES, Fabrício; MATTOS, Jacó Joaquim; LIMA, Daína; LÜCHMANN, Karim Hahn; SASAKI, Silvio Tarou; BÍCEGO, Márcia Caruso; TANIGUCHI, Satie; MONTONE, Rosalinda Carmela; DE ALMEIDA, Eduardo Alves; BAINY, Afonso Celso Dias. Biochemical and molecular responses in oysters *Crassostrea brasiliensis* collected from estuarine aquaculture areas in Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, p. 110–118, 1 out. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.018>.

ZHANG, Guofan; FANG, Xiaodong; GUO, Ximing; LI, Li; LUO, Ruibang; XU, Fei; YANG, Pengcheng; ZHANG, Linlin; WANG, Xiaotong; QI, Haigang; XIONG, Zhiqiang; QUE, Huayong; XIE, Yinlong; HOLLAND, Peter W. H.; PAPS, Jordi; ZHU, Yabing; WU, Fucun; CHEN, Yuanxin; WANG, Jiafeng; ... WANG, Jun. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49–54, 4 out. 2012. <https://doi.org/10.1038/nature11413>.

ZHANG, Yang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 40, 23 jan. 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>.

ZHANG, Yang; SKOLNICK, Jeffrey. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 57, n. 4, p. 702–710, 2004. <https://doi.org/10.1002/prot.20264>.

ZHAO, Guanhua; ZHAI, Xingyue; QU, Min; TONG, Changqing; LI, Wei. Sulfated modification of the polysaccharides from *Crassostrea gigas* and their antioxidant and hepatoprotective activities through metabolomics analysis. **International Journal of**

Biological Macromolecules, v. 129, p. 386–395, 15 maio 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.053>.

ZHENG, Ya-Jun; ORNSTEIN, Rick L. Mechanism of Nucleophilic Aromatic Substitution of 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene by Glutathione in the Gas Phase and in Solution. Implications for the Mode of Action of Glutathione S-Transferases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 4, p. 648–655, 1 jan. 1997. <https://doi.org/10.1021/ja963177v>.

ZHOU, Huina; BROCK, Joseph; LIU, Dan; BOARD, Philip G.; OAKLEY, Aaron J. Structural insights into the dehydroascorbate reductase activity of human omega-class glutathione transferases. **Journal of Molecular Biology**, v. 420, n. 3, p. 190–203, 13 jul. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.04.014>.