



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

Vanessa Schadeck Deconto

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE ALFA 1.2
RECOMBINANTE DE OSTRÁ *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)**

Florianópolis

2022

Vanessa Schadeck Deconto

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE ALFA 1.2

RECOMBINANTE DE OSTRA *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de mestrado em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Coorientadora: Dra. Flávia Lucena Zacchi

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra

Deconto, Vanessa

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE ALFA
1.2 RECOMBINANTE DE OSTRA *Crassostrea gigas* (Thunberg,
1793) / Vanessa Deconto ; orientador, Afonso Bainy,
coorientador, Flávia Zacchi, 2022.
100 p.

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

Inclui referências.

1. Bioquímica. I. Bainy, Afonso . II. Zacchi, Flávia.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Vanessa Schadeck Deconto

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE ALFA 1.2
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. Patrícia Hermes Stoco, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Dáina de Lima, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Maria Risoleta Freire Marques, Dra. (membro suplente)

Universidade Federal de Santa Catarina

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Afonso Celso Dias Bainy, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022

Este trabalho é dedicado às pessoas que lutam pela ciência no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho leva o meu nome na capa, mas com toda certeza apenas foi possível com a ajuda de muitas pessoas queridas. Eu tive a sorte de conhecer o LABCAI no final da minha graduação e encontrar ali um projeto lindo para o meu TCC. Mas ganhei muito mais do que isso, esse é um laboratório formado por pessoas maravilhosas, grandes pesquisadores e conhecedores da bioquímica que eu tenho a enorme felicidade de chamar de amigos. É o local onde encontrei identificação imediata com todos para além da biologia/bioquímica, também nos gostos de musicais, de filmes, memes e me sinto acolhida também como ser humano. Descobri que o trabalho feito com colaboração e amizade é muito prazeroso e produtivo. Sinto que dizer obrigada é pouco por tanto que recebo, ainda assim, OBRIGADA a todos os integrantes.

Agradeço ao meu querido orientador, Afonso Bainy por todo suporte para a pesquisa que eu escolhi, pela confiança no meu potencial e por toda ajuda durante o processo da realização deste trabalho.

A minha coorientadora, Flávia Lucena Zacchi, a melhor do mundo, obrigada por sempre estar disposta a resolver todos os problemas, que sempre são muitos quando trabalhamos com trabalhos experimentais. Obrigada por dividir comigo tua sabedoria, companheirismo e amizade, sinto um privilégio enorme de ter na minha vida, tu és a minha inspiração.

Agradeço ao professor Guilherme Razzera por ter sido como um terceiro orientador para mim, por ter tanta paciência e me ensinar tanto sobre esse mundo que é tão novo como a bioinformática.

Ao Jacó, técnico da UFSC com a sala mais acolhedora no mundo, muito obrigada por ser um bioquímico tão incrível e por ser tão generoso em sempre compartilhar teus conhecimentos, sem tua ajuda esse trabalho não existiria.

Ao Luiz, meu amigo, meu companheiro, meu confidente, meu ajudante, meu mestre. Obrigada por dividir essa vida acadêmica comigo, por ser meu parceiro de lab, contigo a vida segue mais alegre, sempre chorando, de tanto rir.

Daína, obrigada pela tua disposição sempre, por ser tão proativa e um exemplo de pesquisadora para mim e também, claro, por aceitar fazer parte das bancas da minha vida com tanta dedicação e carinho contribuindo muito para a minha formação.

Karin e a Tâmela, essas maravilhosas do LABE por toda a enorme ajuda nesse longo processo de me envolver no mundo da biologia computacional, obrigada.

A professora Maria Risoleta pela sua contribuição direta como membro da banca avaliadora, agregando considerações muito relevantes, muito obrigada. Aos integrantes do LABCAI, ao Clei, Bárbara, Júlia, Vera, Camila, Miguel, Juliana, Luiza, Lígia, Giulia, Isis, Thiago e Roberta muito obrigada pela parceria, pelos cafés e risadas.

Ao Gabriel por todo o apoio do mundo, aguentado a dificuldade que é um final de mestrado com a maior parceria existente, pelas comidinhas, abraços e sorrisos. Por tornar esse período mais leve de ser vivido, sempre me mostrando a parte boa da vida, muito obrigada meu companheiro.

Agradeço infinitamente a minha família, minha mãe, minha vó e meu pai, que sem o suporte, carinho, apoio psicológico e financeiro de vocês eu não conseguiria cursar uma pós-graduação.

Aos meus amigos queridos que estiveram ao meu lado nessa fase tão desafiadora da minha vida, obrigada.

A UFSC, essa instituição incrível, a CAPES e ao CNPq pela bolsa e financiamentos de pesquisa, sem os quais este trabalho não seria possível.

RESUMO

As Glutathione *S*-transferase (GSTs) são uma família de enzimas de biotransformação de fase II envolvidas na proteção contra vários xenobióticos. Suas diferentes isoformas são utilizadas como biomarcadores de contaminação aquática em diversos modelos animais, como no caso da ostra *Crassostrea gigas*, organismo utilizado neste estudo. A classe alfa das GSTs é conhecida por participar no metabolismo de diferentes compostos endógenos em vertebrados, além da sua reconhecida função na biotransformação de xenobióticos. Porém, pouco se sabe sobre as GSTs de *C. gigas* e as possíveis funções de cada classe. Em vista disso, este estudo visou realizar a caracterização estrutural e funcional de uma isoforma da classe alfa de GST (CgGSTA 1.2). Foram realizadas análises *in silico* por biologia computacional (modelagem tridimensional e *docking* molecular) a fim de contribuir com um direcionamento para os experimentos *in vitro* de cinética enzimática. A modelagem tridimensional da proteína foi realizada pelos programas I-TASSER e HADDOCK. A análise de *docking* molecular foi realizada pelo SwissDock utilizando as moléculas de glutathione reduzida (GSH), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e hidroperóxido de cumeno (CHP) como ligantes. As posições do ligante na cavidade da proteína foram avaliadas pela afinidade de ligação (ΔG), posição do ligante comparada a uma estrutura cristalográfica utilizada como controle e interações entre ligante e resíduos. Nas análises *in vitro*, a bactéria *Escherichia coli* cepa BL21 foi transformada com vetor de expressão com o gene de *CgGSTA1.2*. A proteína recombinante expressada foi purificada por cromatografia de afinidade por níquel, dialisada e teve a sua atividade *in vitro* avaliada testando substratos clássicos como CDNB e CHP. Testes com CDNB mostraram atividade de GST da enzima, e através das curvas de saturação foram estimados k_m e V_{max} com valores crescentes de GSH na presença de valor fixo de CDNB. A isoforma ainda mostrou atividade de glutathione peroxidase com o substrato hidroperóxido de cumeno. Os resultados contribuem para a caracterização da família alfa de GSTs e permitirão a realização de estudos ecotoxicológicos mais específicos em moluscos bivalves.

Palavras-chave: Biomarcadores; expressão heteróloga; *docking* molecular; CDNB, CHP, GST.

ABSTRACT

Glutathione S-transferases (GSTs) are a family of phase II biotransformation enzymes involved in the protection against various xenobiotics. Its different isoforms are used as biomarkers of aquatic contamination in several animal models, as in the case of the oyster *Crassostrea gigas*, the species used in this study. The alpha class of GSTs is known to participate in the metabolism of different endogenous compounds in vertebrates, in addition to its well-known role in the biotransformation of xenobiotics. However, little is known about the GSTs of *C. gigas* and the possible functions for each class. So, this study aimed to characterize structural and functionally one isoform of the alpha class of GST (CgGSTA 1.2). *In silico* analysis were performed by computational biology (three-dimensional modeling and molecular docking) in order to contribute with a direction to the *in vitro* experiments of enzymatic kinetics. The protein three-dimensional modeling was performed using the I-TASSER and HADDOCK platforms. Molecular docking analysis was performed by the SwissDock platform using reduced glutathione (GSH), 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and cumene hydroperoxide (CHP) as ligands. The obtained positions in the protein cavity were evaluated by the binding affinity (ΔG), ligand position compared to a control crystal structure used as a control and weak interactions between ligand and residues. For the *in vitro* analysis, bacterium *Escherichia coli*, strain BL21 was transformed with the expression vector containing the *CgGSTA1.2* gene. The expressed recombinant protein was purified by nickel affinity chromatography, dialyzed and had its *in vitro* activity evaluated by testing classical substrates like CDNB and CHP. Tests with CDNB showed enzyme GST activity, and through saturation curves k_m and V_{max} were estimated for increasing values of GSH in the presence of a fixed value of CDNB. The isoform showed glutathione peroxidase activity with the substrate cumene hydroperoxide. The results contribute to the characterization of the alpha family of GSTs and will allow accomplish more specific ecotoxicological studies in bivalve molluscs.

Keywords: Biomarkers; heterologous expression; molecular docking; CDNB, CHP, GST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ostra do Pacífico, <i>C. gigas</i> , com aproximadamente 7cm de tamanho.....	17
Figura 2. Nível de transcritos do gene GSTA.1.2 nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras <i>C. gigas</i> em níveis basais.....	21
Figura 3. Mapa do vetor de expressão para o gene CgGSTA1.2 disponibilizado pela empresa GenOne.....	33
Figura 4. Alinhamento das sequências de GST da classe alfa de diferentes espécies: <i>Plakobranchus ocellatus</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Mytilus edulis</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Gigantopelta aegis</i> , <i>Elysia chlorotica</i> , <i>Candidula unifasciata</i> , <i>C. gigas</i> e <i>Branchiostoma belcheri</i> realizado no programa MUSCLE. Imagem gerada por meio do software Jalview. Setas indicam os resíduos de aminoácidos conservados conhecidos por estarem envolvidos na ligação com a molécula de GSH.....	40
Figura 5. Interações da molécula de glutationa (GS^-) com os resíduos de aminoácidos Y9 e R15 específico da classe alfa das GSTs em mamíferos.....	41
Figura 6. Modelo tridimensional monomérico de CgGSTA realizado no I-TASSER, evidenciando os diferentes sítios da proteína: em rosa o sítio G e em cinza sítio H. A imagem foi obtida no UCSF Chimera.....	43
Figura 7. Modelo monomérico tridimensional da proteína CgGSTA1.2 construído pelo I-TASSER com suas estruturas secundárias descritas e enumeradas, imagem executada no UCSF Chimera.....	46
Figura 8. Resultado do ProSA-web onde o ponto preto representa CgGSTA, os pontos em azul claro representam todas as estruturas depositadas no PDB pela metodologia de raio-x e em azul escuro por NMR, o eixo X representa o tamanho da proteína e o eixo Y o valor de Z-score..	49
Figura 9. Modelo da estrutura 3D dimérica da proteína CgGSTA1.2 construída pelo HADDOCK, imagem realizada no Chimera.....	50
Figura 10. Sobreposição do modelo dimérico construído da proteína GSTA de <i>C. gigas</i> (em rosa) com modelo experimental da proteína retirado do PDB: 1VF1.1 de <i>G. gallus</i> (em cinza), realizado no UCSF Chimera.....	51
Figura 11. Gráfico de Ramachandran do modelo de GSTA de <i>C. gigas</i> . Em verde são observados os ângulos torção considerados altamente favoráveis, em laranja ângulos favoráveis e em vermelho observações questionáveis, criado pelo Ramachandran Plot Server.....	52

Figura 12. <i>Docking</i> de CgGSTA1.2 (em rosa) com a molécula de GSH (em cinza) com zoom no bolsão de ligação e os aminoácidos possivelmente envolvidos na estabilização desta ligação em destaque, Y13, R17, R19, Q58, Q70 e T71, realizado na SwissDock, imagem gerada pelo UCSF Chimera.	55
Figura 13. Sobreposição dos ligantes, em rosa GSH do docking realizado de <i>C. gigas</i> e em cinza, a GSH do modelo experimental PDB:1VF1, imagem gerada pelo software UCSF Chimera.	56
Figura 14. <i>Docking</i> da proteína CgGSTA1.2 com o ligante 1 (GSH) em formato 2D evidenciando a interação com os resíduos de aminoácidos Y13, Q58, Q70 e T71, em vermelho as interações hidrofóbicas com os aminoácidos F45, K57, V59, P60 e L222 sobreposto ao modelo cristal (PDB: 1VF1) ao fundo em cinza. Os círculos vermelhos mostram as compatibilidades entre os resíduos das duas estruturas realizada pelo <i>software</i> LigPlot.....	57
Figura 15. Sobreposição dos ligantes GSH do cristal PDB:1VF1 depositado no PDB (em cinza) e do <i>redocking</i> executado no SwissDock (em rosa) imagem gerada através do <i>software</i> UCSF Chimera.	58
Figura 16. <i>Docking</i> realizado no SwissDock entre a proteína CgGSTA1.2 com o ligante GDN (em cinza) em evidência as cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos na interação: Y13, R19 e Q68, imagem realizada no UCSF Chimera.	59
Figura 17. <i>Docking</i> da proteína CgGSTA1.2 com GDN em sua forma 2D (colorido) sobreposta com o cristal 1VF3 (em cinza). Interações entre resíduos de aminoácidos em evidência Y13, R19 e Q58 e interações hidrofóbicas em vermelho para os resíduos G18, V59, T72, L111, F115 e L222, os círculos representam sobreposições entre os resíduos das duas estruturas. Imagem realizada no LigPlot.....	60
Figura 18. Sobreposição dos ligantes GDN do docking de CgGSTA1.2 (em rosa) e do cristal PDB:1VF3 (em cinza), imagem realizada no UCSF Chimera.	61
Figura 19. Sobreposição dos ligantes GDN do <i>redocking</i> (em rosa) e do cristal PDB: 1VF3 (em cinza) imagem realizada no UCSF Chimera.	61
Figura 20. <i>Docking</i> entre CgGSTA1.2 e o ligante hidroperóxido de cumeno (em cinza). Em evidência as cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos na interação: Y13, F14, Y214 e I215. Imagem obtida no UCSF Chimera.	62
Figura 21. A) Meio de cultura LB ágar contendo antibiótico cloranfenicol e ampicilina sem BL21, controle negativo. B) Placa contendo meio de cultura LB ágar, sem antibióticos, com crescimento da bactéria BL21 transformada. C) Placa contendo meio de cultura LB ágar com	

antibióticos cloranfenicol e ampicilina, com crescimento de BL21 transformada com DNA plasmidial.....	65
Figura 22. Cromatograma da purificação da proteína rGSTA1.2 em FPLC - ÄKTA. Em azul está apresentada a leitura UV das proteínas, as injeções da amostra em rosa, a concentração do tampão B contendo imidazol em verde e as frações coletadas das amostras em vermelho. Os picos de eluição da proteína se encontram nas frações 12 a 14.....	66
Figura 23. SDS-PAGE das frações de purificação da proteína rGSTA1.2. Da esquerda para a direita marcador molecular <i>unstained</i> ; marcador molecular <i>rainbow</i> ; fração 14; fração 13; fração 12; fração 11; fração 10; fração 5 e fração 2, gel corado com azul de <i>coomassie</i> , em destaque vermelho rGSTA purificada.	67
Figura 24. Curva de saturação do substrato CDNB em concentração crescente de 0,0014 - 2,5mM com GSH em concentração fixa de 2,5 mM.....	70
Figura 25. Curva de saturação do substrato CDNB com concentração crescente de 0,0014 - 2,5 mM e concentração fixa de GSH 5 mM.....	71
Figura 26. Curva de saturação de GSH com concentração crescente de 0,0048 a 5 mM e CDNB 2,5 mM.....	72
Figura 27. Curva de saturação de CHP com concentração crescente de 0,25 a 32 mM.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de identidade entre as GSTA de todas as espécies do alinhamento: <i>Homo sapiens</i> , <i>Branchiostoma belcheri</i> , <i>C. gigas</i> , <i>Mytilus edulis</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Gigantopelta aegis</i> , <i>Candidula unifasciata</i> , <i>Plakobranhus ocellatus</i> e <i>Elysia chlorotica</i> , criada pelo MUSCLE.	42
Tabela 2. Percentual de identidade de GSTs alfa das espécies do alinhamento <i>Homo sapiens</i> , <i>Branchiostoma belcheri</i> , <i>C. gigas</i> , <i>Mytilus edulis</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Gigantopelta aegis</i> , <i>Candidula unifasciata</i> , <i>Plakobranhus ocellatus</i> , <i>Elysia chlorotica</i> contra <i>C. gigas</i> nos sítios G e H da proteína, gerado pelo MUSCLE.	44
Tabela 3. <i>Templates</i> de <i>threading</i> usados pelo I-TASSER com seus valores de identidade referentes ao modelo construído.	47
Tabela 4. <i>Top 10 hits</i> de estruturas de proteínas depositadas no PDB usados pelo I-TASSER na modelagem.	47
Tabela 5. Valores de atividade de glutationa transferase com substrato CDNB em diferentes concentrações de proteína recombinante, resultados em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.	69
Tabela 6. Valores de atividade de GST com substrato CDNB em diferentes organismos, dados retirados da literatura, resultados em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.	69
Tabela 7. Valores de k_m com substrato CDNB para diferentes organismos.	72
Tabela 8. Valores cinéticos para atividade de glutationa peroxidase com substrato CHP, resultados em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.	73
Tabela 9. Atividade literatura para o substrato CHP.	74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 A PROBLEMÁTICA DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA E OS BIOMARCADORES	15
1.2 PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO	18
1.3 AS GLUTATIONA S-TRANSFERASE - GSTs	19
1.4 ESTRATÉGIAS DE CARACTERIZAÇÃO	23
1.4.1 <i>IN SILICO</i>	23
1.4.2 <i>IN VITRO</i>	25
1.5 SUBSTRATOS DA GST ALFA	26
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i>	30
3.1.1 SEQUÊNCIA	30
3.1.2 MODELO TRIDIMENSIONAL	31
3.1.3 <i>DOCKING</i> MOLECULAR	31
3.2 ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	32
3.2.1 BACTÉRIAS CÁLCIO COMPETENTES	34
3.2.2 TRANSFORMAÇÃO	34
3.2.3 EXPRESSÃO	35
3.2.4 PURIFICAÇÃO	35
3.2.5 DIÁLISE	36
3.2.6 TESTE DE ATIVIDADE	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 <i>IN SILICO</i>	38
4.1.1 SEQUÊNCIA	38
4.1.2 ALINHAMENTO	38
4.1.3 MODELOS TRIDIMENSIONAIS	44
4.1.4 FORMAÇÃO DOS DÍMEROS	49
4.1.5 <i>DOCKING</i> MOLECULAR	53
4.2 <i>IN VITRO</i>	64
4.2.1 TRANSFORMAÇÃO E EXPRESSÃO	64
4.2.2 PURIFICAÇÃO	65

4.2.3 DIÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	67
4.2.4 CINÉTICA	68
5. CONCLUSÕES	76
6. REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE A	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 A PROBLEMÁTICA DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA E OS BIOMARCADORES

As zonas costeiras possuem alta concentração demográfica devido a sua importância na oferta de recursos de subsistência. Dessa forma, as interações humanas tornam estes ambientes sensíveis e vulneráveis à contaminação (NEUMANN *et al.*, 2015; SEKOVSKI; NEWTON; DENNISON, 2012). Os animais marinhos e seu habitat recebem cada vez mais agentes estressores através de interações antropogênicas. Essas atividades podem comprometer significativamente a saúde dos ecossistemas costeiros que receberem insumos excessivos de nutrientes, metais, microplásticos e sedimentos (HE; SILLIMAN, 2019; LU *et al.*, 2018).

Halpern e colaboradores (2008) demonstraram que todas as áreas de ecossistemas marinhos analisadas em conjuntos de dados globais estavam afetadas por influência humana e que 41% destas áreas estavam fortemente impactadas. Posteriormente, Halpern *et al.* (2015) mapearam e calcularam mudanças nos impactos aos ecossistemas marinhos provenientes da pesca, mudanças climáticas e estressores oceânicos e terrestres, ao longo de cinco anos em todo o mundo. Por meio deste estudo, foi possível observar que cerca de 66% dos oceanos sofreram aumentos no impacto cumulativo por estressores humanos ao longo do período de estudo. Ainda, em um terceiro estudo publicado em 2019, o grupo analisou 21 ecossistemas marinhos durante onze anos e apresentou evidências de que 59% dos oceanos estão sofrendo impactos crescentes devido às mudanças climáticas, pesca, poluição de origem terrestre e transporte marítimo (HALPERN *et al.*, 2008, 2015, 2019).

As mudanças climáticas também podem causar impactos nos ecossistemas costeiros em diferentes níveis de organização biológica. Essas mudanças podem causar alterações nos padrões de expressão gênica, fisiologia celular de todo o organismo, podendo afetar a sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento das espécies (HE; SILLIMAN, 2019). Por fim, a contaminação aquática pode ser agravada quando há a falta de tratamento dos efluentes (LUZ, 2020), associada a lançamentos de esgoto diretamente nos recursos hídricos (BATTISTELLA, 2021; NSC TV; G1 SC, 2020).

Diante desse panorama crítico, é necessário monitorar a qualidade da água e diferentes estratégias estão sendo desenvolvidas para avaliar os efeitos causados pela presença de contaminantes no ambiente aquático, dentre elas, a utilização dos biomarcadores. Os biomarcadores são alterações biológicas em nível molecular, bioquímico, celular e fisiológico

que podem expressar os efeitos tóxicos causados pelos xenobióticos. São modificações bioquímicas, ou seus produtos, que podem indicar intensidade de exposição devido a um efeito ambiental e químico nos organismos (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003; WALKER *et al.*, 2001). Os xenobióticos são substâncias químicas que podem estar presentes na água e não são parte integrante do metabolismo dos organismos do meio (BONIFACIO; HUED, 2019; GAGNÉ, 2014; LÜCHMANN *et al.*, 2014). Os estudos de monitoramento ambiental têm por objetivo analisar biomarcadores em animais provenientes de locais com diferentes graus de contaminação com a finalidade de quantificar os efeitos e a exposição frente aos xenobióticos (BELIAEFF; BURGEOT, 2002; CROOM, 2012; RODRÍGUEZ-ORTEGA *et al.*, 2002). Várias enzimas e proteínas podem mostrar respostas a contaminantes, tais como: citocromo P450 (CYP), flavinas-monooxigenases (FMOs) e enzimas de conjugação como as GSTs. Ainda, defesas antioxidantes podem ser propostas como biomarcadores devido a sua produção ocorrer devido a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos organismos. Esse processo conta com enzimas de defesa antioxidante, tais como superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT, glutatona peroxidase - GPx entre outras (BEBIANNO *et al.*, 2017; HUGGETT *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2012).

Organismos sentinela ou animais modelo, são utilizados para se ter uma estimativa do impacto dos contaminantes através de testes laboratoriais (MOORE *et al.*, 2004; PARENTE; HAUSER-DAVIS, 2014). Moluscos bivalves, como ostras e mexilhões, são organismos sentinela para monitoramento de contaminação aquática comumente utilizados devido à plasticidade de suas características morfofisiológicas, sua ampla distribuição geográfica e importância econômica (REMENTERIA *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-ORTEGA *et al.*, 2002; ZACCHI, 2017). Esses animais se alimentam filtrando grandes quantidades de água e extraindo partículas orgânicas e inorgânicas, as excluindo por tamanho em seus palpos labiais e brânquias. Portanto, podem ter a capacidade de bioacumular xenobióticos em seus tecidos, refletindo dessa forma a poluição do ambiente (MIOSSEC; LEDEUFF; GOULLETQUER, 2009; VIDAL *et al.*, 2002).

A ostra da espécie *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) ([Figura 1](#)) é popularmente conhecida como a ostra do Pacífico. Devido a sua ampla tolerância às condições ambientais e ao seu crescimento rápido, *C. gigas* é um dos moluscos bivalves mais cultivados e consumidos no mundo. O estado de Santa Catarina é responsável pela produção de mais de 90% das ostras da espécie *C. gigas* no Brasil. Suas sementes são cultivadas e distribuídas pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) através do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) associado à Epagri (BOING, 2019; FAO, 2019; MAO *et al.*, 2006; VARGAS, 2019).

Figura 1. Ostra do Pacífico, *C. gigas*, com aproximadamente 7cm de tamanho.



Fonte: a autora.

A ostra *C. gigas* é um dos organismos sentinela mais utilizados no monitoramento ambiental e esses estudos atualmente estão facilitados e suportados pelo sequenciamento e publicação do seu genoma por ZHANG *et al.*, (2012) e atualização por WANG *et al.*, (2019). Detectar e avaliar possíveis alterações biológicas resultantes de contaminação aquática podem ajudar a identificar quais são esses contaminantes e sua origem. O monitoramento ambiental por meio de marcadores biológicos pode fornecer alertas sobre as condições do ambiente aquático, como evidências de contaminação, e assim, pode permitir a implementação de medidas adequadas para o combate a situações de estresse ambiental (CAJARAVILLE *et al.*, 2000; HUGGETT *et al.*, 2018).

1.2 PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Algumas enzimas envolvidas no processo de biotransformação podem ser utilizadas como biomarcadores de contaminação por serem induzidas ou inibidas pela exposição aos xenobióticos (BONIFACIO; HUED, 2019; GAGNÉ, 2014; LÜCHMANN *et al.*, 2014). Estimar efeitos biológicos em organismos aquáticos apenas avaliando concentração de xenobióticos nos tecidos, ou em seu habitat pode não ser suficiente. Sendo assim, se faz necessário analisar alterações biológicas mais complexas para avaliar os possíveis efeitos da contaminação. A maioria dos xenobióticos possuem natureza lipofílica, e devido a essa característica, sua excreção dos organismos é difícil. O sistema de biotransformação pode metabolizar compostos lipofílicos convertendo-os em moléculas hidrofílicas e mais facilmente excretáveis (MOORE *et al.*, 2004; OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O processo de biotransformação pode ser dividido em duas fases (I e II), devido à função de enzimas específicas envolvidas (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017; LIVINGSTONE, 1998). O xenobiótico, quando no organismo, pode ser biotransformado por enzimas de fase I que participam de reações de hidrólise, oxidação e redução, catalisadas principalmente pela família do citocromo P450 (CYP450) e flavinas-monooxigenases (FMOs) (BENEDETTI, 2011). A fase II, que conta com algumas enzimas, como a glutatona *S*-transferase (GST), UDP - glicuroniltransferases (UGTs) e sulfotransferases (SULTs), é caracterizada por reações de conjugação de compostos biotransformados na fase I, ou que já possuem centro eletrofílicos expostos, a moléculas endógenas (DALHOFF; JENSEN; POULSEN, 2005; UEDA *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2001). Além disso, uma terceira fase pode acontecer, quando os compostos biotransformados são transportados para fora da célula por proteínas de membrana e componentes do sistema de resistência de múltiplos xenobióticos (MXR) (LUCKENBACH; EPEL, 2008; RIOULT *et al.*, 2014).

As enzimas glutatona *S*-transferase (GSTs) EC 2.5.18 participam da fase II de biotransformação catalisando a conjugação de diferentes compostos eletrofílicos à molécula de glutatona reduzida, GSH (γ Glu-Cys-Gly;) (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Essa família de enzimas constitui um componente importante da via de desintoxicação de quase todos os organismos vivos. Contudo essas enzimas podem possuir outros tipos de atividades, como de peroxidase e isomerase, além de participar em diversas vias endógenas como: biossíntese de hormônios, síntese e inativação de eicosanoides, transporte intracelular e

regulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (AWASTHI, 2006; SHEEHAN *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2004).

1.3 AS GLUTATIONA S-TRANSFERASE - GSTs

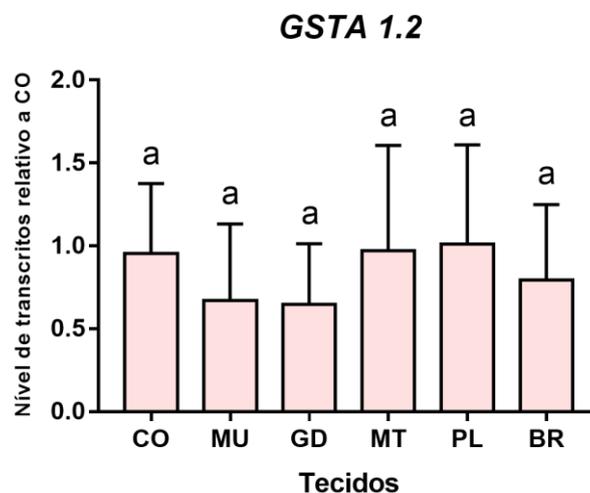
As GSTs podem ser citosólicas, mitocondriais e microsossomais (MAPEG - *Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*) (NEBERT; VASILIOU, 2004; OAKLEY, 2011). A família das GSTs é composta por diversas classes. Em mamíferos, por exemplo, já foram identificadas sete diferentes classes citosólicas (alfa, mi, pi, sigma, teta, ômega e zeta) (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; PEMBLE; WARDLE; TAYLOR, 1996). Também existem as classes exclusivas de grupos não-mamíferos, como: rho, beta, phi, tau, delta e epsilon (RANSON; HEMINGWAY, 2005; SHEEHAN *et al.*, 2001; SORANZO *et al.*, 2004). Porém, em moluscos bivalves, como as ostras, pouco se sabe sobre as classes de GST que podem ser encontradas nesses animais (MARTINS *et al.*, 2014).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica - LABCAI da UFSC em estudos de pós-doutorado, mestrado e graduação, realizou uma triagem do genoma da ostra *C. gigas*, disponível nos bancos de dados públicos a partir dos trabalhos de Zhang *et al.*, (2012) e Wang *et al.*, (2019). No estudo de Zacchi e colaboradores (dados não publicados) foram recuperados os dados da montagem do genoma da ostra *C. gigas* (versão 9.0) e os dados do transcriptoma de RNAseq de cinco tecidos (brânquias, glândula digestiva, palpos labiais, manto e músculo adutor). Os transcritos membros da família das GSTs foram identificados a partir de comparações com o banco de proteínas não redundantes do National Center for Biotechnology Information (NCBI), com o banco de família de proteínas PFAM-A (BATEMAN *et al.*, 2004) e PRINTS (ATTWOOD *et al.*, 2003). Foi considerada a presença dos domínios funcionais DSBA (PF01323) para a GSTs mitocondrial; dos domínios C-terminal (PF00043; PF14497; PF13410) e N-terminal (PF02798; PF13409; PF13417) para as GSTs citosólicas; e do domínio MAPEG (PF01124) para as GSTs microsossomais (OAKLEY, 2011). Dessa forma foi possível identificar oito classes de GSTs citosólicas: ômega, rho, sigma, alfa, pi, mi, delta e teta, além de uma isoforma mitocondrial (kappa) e três microsossomais (1, 2 e 3), totalizando 24 sequências de GSTs de *C. gigas*.

Este estudo possibilitou a realização do trabalho de conclusão de curso (TCC) de licenciatura em Ciências Biológicas (DECONTO, 2019). Nesse trabalho foram desenhados iniciadores específicos para a identificação da transcrição basal de 19 isoformas de GSTs em seis diferentes tecidos (manto, brânquias, palpos labiais, coração, músculo adutor e glândula digestiva) da ostra *C. gigas*. A realização desse estudo possibilitou a validação da identificação das sequências e nomenclatura desses genes de GSTs nos diferentes tecidos dessa espécie de ostra pela primeira vez.

O nível de transcritos de genes e atividade de enzimas relacionados ao sistema de biotransformação de bivalves são frequentemente utilizados em estudos de biomonitoramento devido a sua capacidade de metabolizar diversos contaminantes ambientais (RAND, 1995; SACCO, 2006). O aumento no nível de transcritos dos genes de *GST* pode ser parte de um processo de adaptação que permite à célula sobreviver à exposição a xenobióticos prejudiciais (AWASTHI, 2006). Contudo, no estudo de Deconto (2019) a análise realizada avaliou os níveis de transcritos dos genes de GSTs em diferentes tecidos em níveis basais, sem qualquer exposição prévia à xenobióticos ou quaisquer contaminantes. Essa técnica foi empregada a fim de provar e validar a presença das classes desses genes e suas isoformas que foram identificadas pelo grupo de pesquisa. Dessa forma, foi escolhida uma das classes para ser estudada de forma específica com a finalidade de obter uma caracterização estrutural e funcional. Em destaque a classe alfa, na qual os níveis de transcritos do gene *CgGSTA1.2* (Figura 2) foram analisados em diferentes tecidos da ostra *C. gigas*. Nenhuma diferença significativa na transcrição de *CgGSTA1.2* foi observada entre os tecidos analisados, assim sendo sua presença semelhante nos tecidos da ostra (DECONTO, 2019). A partir desses resultados, *CgGSTA1.2* foi selecionado para as análises de caracterização da proteína por ele codificada. Concomitantemente, o grupo do LABCAI também realizou estudos com as classes teta e ômega e assim, a escolha pela classe alfa foi feita para que na união dessas pesquisas fosse possível fazer um apanhado para três grandes classes da enzima em *C. gigas* e gerar a possibilidade de se traçar um paralelo entre elas. Apesar de uma das 24 GSTs identificadas ter sido escolhida para a caracterização específica em nível de mestrado, em simultâneo foram realizadas as análises de biologia computacional para as demais isoformas citosólicas e mitocondrial de *C. gigas* que podem ser encontradas no apêndice A deste estudo.

Figura 2. Nível de transcritos do gene *GSTA.1.2* nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *C. gigas* em níveis basais.



Fonte: DECONTO, 2019.

Estruturalmente as GSTs citosólicas são proteínas diméricas, homo ou heterodiméricas, e cada subunidade possui em média de 199 a 244 aminoácidos e são compostas por dois domínios, N-terminal e C-terminal (FROVA, 2006). O domínio N-terminal é semelhante a tiorredoxinas e constitui cerca de um terço da proteína, sendo composto por quatro folhas- β e três α -hélices, formando o motivo $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$ (MARTIN, 1995). Este domínio é altamente conservado e é onde se encontram a maioria dos sítios de ligação de GSH, também chamado de sítio G. Os dois terços do domínio C-terminal é α -helicoidal e fornece a orientação adequada do eletrófilo para a reação com a GSH (sítio H). Este sítio, por sua vez, varia muito em forma e caráter químico entre as classes (ARMSTRONG, 1997; AWASTHI, 2006; KALITA *et al.*, 2017; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

A reação de conjugação catalisada por uma GST ocorre com a conjugação do grupo sulfidrílico da glutatona com os grupos eletrofílicos dos compostos xenobióticos, gerando produtos menos tóxicos e mais excretáveis. O evento catalítico das GSTs acontece em dois processos: ligação e ativação da GSH e ligação com o composto eletrofílico. O primeiro é semelhante entre as classes de GSTs citosólicas, já o segundo processo depende do composto que está envolvido (AWASTHI, 2006). O tiol da glutatona é estabilizado por uma ligação de hidrogênio entre o átomo de enxofre e uma hidroxila da proteína. Na maioria das GSTs de mamíferos, o doador da ligação de hidrogênio é a hidroxila de uma tirosina 9 (Y9) da região N-terminal (ALLARDYCE *et al.*, 1999). Porém nas GSTs da classe alfa existe uma interação

adicional de um átomo de nitrogênio da arginina 15 (R15) com o enxofre da GSH que também ajuda a estabilizar o tiolato, interação já descrita para mamíferos (BJÖRNSTEDT *et al.*, 1995; GILDENHUYS *et al.*, 2010; SALINAS; WONG, 1999). Na ativação da GSH pela GST, a glutathiona reduzida se liga firmemente à enzima por meio de múltiplas interações no sítio G. O grupo SH da glutathiona é estabilizado por ligação de hidrogênio com uma tirosina do sítio ativo, que guia o enxofre para a ligação com o segundo substrato (DOURADO; FERNANDES; RAMOS, 2010; MANNERVIK; DANIELSON; KETTERER, 1988). Ainda para a classe alfa, os resíduos de glutamina e a treonina também estão envolvidos na ligação com a GSH, contudo o sítio ativo pode estar coberto por uma α -hélice C-terminal ($\alpha 9$) móvel, conforme observado em mamíferos e impedir que essas interações aconteçam (LAWLESS *et al.*, 2018). A ligação com o composto eletrofílico acontece no sítio H, que é relativamente hidrofóbico e altamente variável entre as classes de GSTs, e conta com a interação de diferentes resíduos de aminoácidos envolvidos com diferentes substratos. O papel do sítio H é ligar o substrato eletrofílico e orientá-lo para o ataque nucleofílico pelo grupo tiol da GSH (AWASTHI, 2006; SALINAS; WONG, 1999).

As classes de GST são classificadas de acordo com a sua função, estrutura e quanto aos resíduos de aminoácidos presentes em seu sítio catalítico. A orientação da GSH no sítio ativo pode ser semelhante entre as isoformas, porém existem algumas diferenças nos resíduos de aminoácidos envolvidos nessas interações (AWASTHI, 2006; FROVA, 2006). O motivo $\beta\beta\alpha$, localizado entre a folha β -4 e α -3, é o local de interação de pontes de hidrogênio com a GSH (ARMSTRONG, 1997). Isto pode dividir as GSTs em dois subgrupos: Y-GSTs, sendo aquelas que utilizam um resíduo de tirosina para a ativação da glutathiona (isoformas alfa, mi, pi e sigma) e S/C-GSTs, sendo as que utilizam um resíduo de serina ou cisteína (teta e ômega) (OAKLEY, 2011). Estruturalmente as GSTs citosólicas se apresentam em forma de dímeros na maioria das vezes, elas funcionam amplamente como homodímeros. Porém em algumas classes, como alfa e mi, pode ocorrer a heterodimerização entre subunidades pertencentes à mesma classe (e.g. GSTA1-2) (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; PASTORE *et al.*, 1998). Cada monômero funciona de forma independente, contudo a estrutura quaternária da proteína, na sua forma dimérica, é essencial para a sua atividade (SHEEHAN *et al.*, 2001).

1.4 ESTRATÉGIAS DE CARACTERIZAÇÃO

1.4.1 *IN SILICO*

Uma das características essenciais para uma enzima ser classificada como uma GST é ter a capacidade de se ligar a uma glutatona (GSH) (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Essa característica pode ser identificada através de estudos que aplicam métodos de bioinformática em análises *in silico* com objetivo de simular sistemas biológicos.

As proteínas são as moléculas mais abundantes em uma célula e o seu arranjo tridimensional tem alta relevância visto que está intimamente ligado à sua função. Assim a determinação da estrutura proteica pode fornecer a compreensão da função da proteína (WHITFORD, 2005). Todas as estruturas tridimensionais de proteínas são consideradas modelos, com níveis variáveis entre dados experimentais e estimativas computacionais. Existem técnicas experimentais como a cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) e crio microscopia eletrônica (cryo-EM) para a obtenção de coordenadas espaciais dos átomos (CARRONI; SAIBIL, 2016; SOLETTI, 2015).

Na predição computacional do modelo tridimensional de proteínas utiliza-se alto poder de processamento através de diferentes análises. Os modelos podem ser estimados com técnicas baseadas em estruturas 3D conhecidas e abordagens como *ab initio*, que são técnicas independentes de estruturas conhecidas. Existindo uma estrutura de referência conhecida, os *softwares* se baseiam em alinhamentos com esses moldes, ou também chamados *templates* específicos evolutivamente relacionados, disponíveis em bancos de dados públicos (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; WATERHOUSE *et al*, 2018). Nesse grupo se encontram as modelagens por método de *threading*, que fragmenta a sequência de entrada na busca por estruturas homólogas realizando diversos alinhamentos. A modelagem é realizada de forma comparativa para cada molde selecionado, criando assim estruturas secundárias para cada região. Dessa forma é um método adequado para modelos com *templates* de baixa identidade, pois assim é possível cobrir diferentes partes da sequência de entrada com diferentes *templates* (SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021; VERLI, 2014).

O I-TASSER (*Iterative Threading Assembly Refinement*) é um servidor *web* para predição automatizada de estrutura e função de proteínas (ZHANG, 2008). Usando a sequência de entrada, o I-TASSER primeiro identifica *templates* estruturais ou motivos de estrutura secundária na biblioteca do *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000). Para isso, usa *Local Meta-Threading-Server* (LOMETS) (WU; ZHANG, 2007), um programa de *meta-*

threading que consiste em vários algoritmos de *threading*. Após encontrar os moldes mais adequados à sequência alvo, a topologia dos modelos é construída remontando os fragmentos alinhados. Contudo, as estruturas das regiões não alinhadas que não possuem moldes são construídas por dobramento *ab initio* com base em simulações de Monte Carlo (YANG; ZHANG, 2015; ZHANG, 2008; ZHANG; KOLINSKI; SKOLNICK, 2003).

Após a predição do modelo 3D para a proteína de interesse é necessário verificar a sua qualidade de construção e possíveis erros existentes. Por serem modelos construídos por métodos computacionais são passíveis de erros e avaliar a sua qualidade é necessário (SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021). Entre as avaliações de qualidade utilizadas, o gráfico de Ramachandran, baseado nas conformações permitidas do *backbone* da proteína, tem sido uma das ferramentas de diagnóstico mais poderosas na análise da estrutura (ANDERSON *et al.*, 2005). Além disso, comparações do modelo predito com estruturas experimentais realizando sobreposições e avaliações de Z-score e RMSD (*root mean square deviation*) são importantes para avaliar a qualidade da estrutura e a distância dos resíduos entre duas estruturas alinhadas, comparando diretamente suas coordenadas espaciais (MAITI *et al.*, 2004; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007; ZHANG; SKOLNICK, 2005).

Com o modelo 3D construído e sua qualidade verificada e garantida, é possível estudar a predição da posição de encaixe de um ligante com a enzima de interesse, o atracamento ou *docking* molecular. Com essa análise é possível investigar o potencial de interação entre a molécula da proteína e um ligante (DONG *et al.*, 2014). Através dessa técnica é possível validar o modelo construído a partir da sequência aminoacídica como uma GST devido sua interação, ou não, com a GSH. O objetivo do *docking* molecular é compreender o reconhecimento molecular prevendo os modos de ligação prováveis e afinidade energética de ligação entre uma molécula do ligante e uma proteína (SOUSA; FERNANDES; RAMOS, 2006). Como forma de controle para as análises, pode-se utilizar um cristal conhecido de um complexo de interesse experimental e separar o seu ligante, para em seguida, encaixar o ligante de volta na forma apo da proteína, processo conhecido como *redocking*. O sucesso pode ser avaliado em termos de RMSD dos átomos do ligante do *docking* e da referência. O *docking* envolve encontrar o modo de ligação mais favorável de um ligante ao alvo de interesse. Poses podem ser escolhidas segundo valores de ΔG e comparações à estrutura cristalográfica de referência retiradas do PDB (DAR; MIR, 2017; MORRIS; LIM-WILBY, 2008).

O SwissDock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011) é um programa *online* para prever as interações moleculares que podem ocorrer entre uma proteína alvo e uma molécula pequena, ligante. SwissDock é baseado no *software* de *docking* EADock DSS (GROSDIDIER;

ZOETE; MICHELIN, 2007) seu algoritmo consiste em muitos modos de encaixe que podem ser gerados em uma caixa (*local docking*) ou nas proximidades de todas as cavidades do alvo (*blind docking*). Simultaneamente, suas energias CHARMM são estimadas, os modos de ligação e as energias mais favoráveis são avaliados com FACTS e são formados clusters, os mais favoráveis podem ser visualizados *online* ou por *download* (GROSDIDIER; ZOETE; MICHELIN, 2011).

1.4.2 *IN VITRO*

Além das técnicas da biologia computacional, os protocolos *in vitro* podem auxiliar na identificação de uma enzima, indicar sua função e de seus substratos específicos. Por exemplo, por meio da técnica da expressão heteróloga e purificação de proteínas recombinantes. Estas são ferramentas fundamentais para estudos estruturais e funcionais bioquímicos de uma proteína (OVERTON, 2014). As tecnologias de DNA recombinante são exploradas para a obtenção de novas combinações de material genético de diferentes organismos. Muitos hospedeiros podem ser usados para a produção de proteínas recombinantes, como bactérias, leveduras, insetos, plantas e animais (KHAN *et al.*, 2016). *Escherichia coli* tem sido o meio mais utilizado de produção de proteínas recombinantes, pois são organismos que têm crescimento rápido, em um período curto, necessitam pouco espaço físico, sua genética é bem compreendida e tem boa aceitação de material genético exógeno (ZERBS; GIULIANI; COLLART, 2014). As proteínas expressas em bactérias como *E. coli* podem ser produzidas em grandes quantidades com facilidade e com custos razoáveis. Essas proteínas podem ser obtidas com a pureza necessária para produção/pesquisa de produtos farmacêuticos, bem como para estudos estruturais de caracterização (GILEADI, 2017; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; MANNERVIK, 2005). De forma ideal, a proteína de interesse pode ser purificada diretamente a partir do organismo de estudo. Contudo, este pode ser um trabalho mais dispendioso e complicado do que empregar a expressão heteróloga por um hospedeiro de fácil manuseio como é o caso das bactérias (BANEYX, 1999; GOPAL; KUMAR, 2013). O objetivo de se adotar uma estratégia de expressão heteróloga é a obtenção de uma grande produção de proteínas com características funcionais e bioquímicas correspondentes ao seu estado nativo.

Um vetor de expressão pode ser projetado para que um gene específico seja transcrito e traduzido em um organismo desejado. Plasmídeos são utilizados como vetores para a clonagem e expressão de genes exógenos ao organismo procariótico utilizado. Estes são elementos

extracromossômicos de DNA que são capazes de transmissão horizontal. Bactérias podem transferir DNA naturalmente de uma para a outra pelo processo de conjugação que acontece pelo contato por estruturas filamentosas (CABEZÓN *et al.*, 2014; DIONISIO *et al.*, 2005). Por meio de engenharia genética são criados métodos *in vitro* que auxiliam na transformação, ou seja, na incorporação do DNA plasmidial induzida pelo método de choque térmico onde as bactérias tornam-se competentes para captação desse plasmídeo (BROOKS *et al.*, 2014). A técnica de choque térmico pode facilitar a entrada do DNA na célula possivelmente por interferir na fluidez da membrana levando a incorporação do plasmídeo (PANJA *et al.*, 2008). Com o DNA de interesse inserido na bactéria, ocorre a indução da expressão da proteína pela adição de um indutor como o isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (ZERBS; GIULIANI; COLLART, 2014). O promotor é essencial no sistema de expressão, pois realiza o controle do início da transcrição do gene de interesse. O sistema de expressão pET depende de um hospedeiro *E. coli* carregue o gene que codifica a RNA polimerase do bacteriófago T7, e esse gene fica sob controle do promotor induzível por IPTG além de ser uma cepa robusta capaz de crescer em meios mínimos (GOPAL; KUMAR, 2013; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; OVERTON, 2014). Após a expressão é possível purificar a proteína recombinante por cromatografia líquida rápida de proteínas, *fast protein liquid chromatography* (FPLC) para avaliações estruturais e de atividade (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

1.5 SUBSTRATOS DA GST ALFA

A identificação da atividade enzimática frente a diferentes substratos pode ajudar a compreender as funções que a enzima de interesse assume no animal de estudo. Diferentes GSTs da classe alfa de mamíferos já foram caracterizadas (GSTA1-1, GSTA2-2, GSTA3-3 e GSTA4-4), porém foi descrito que, em particular, GSTA1-1 tem atividade com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em contraste com GSTA4-4 que possui eficiência catalítica mais específica com o 4-hidroxinonenal (4-HNE). Isso pode indicar que as diferentes especificidades dos substratos dependem das características do sítio ativo e o posicionamento dos resíduos de aminoácidos estruturais (FROVA, 2006).

A GST alfa é descrita em diferentes estudos com a atividade de glutathione *S*-transferase, pela formação de um tioéter entre GSH e um substrato eletrofílico, por exemplo, pela formação de S-(2,4-dinitrofenil) glutathione a partir do CDBN. O CDBN é uma molécula pequena se

comparada ao sítio H das GSTs, é conjugado pela maioria das classes e por esse motivo é amplamente utilizado como um substrato considerado universal para quantificar sua atividade (AWASTHI, 2006; MANNERVIK; JEMTH, 2002). Além disso, outros substratos já foram bem descritos para as GSTs, como é o caso do 1,2-dicloro-4-nitrobenzeno (DCNB), um produto químico utilizado na síntese de intermediários que posteriormente são processados em herbicidas, bactericidas e corantes, de mecanismo parecido com o substrato CDNB (ARAKAWA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; WANG, 2002).

A conjugação da GSTA, em mamíferos, com 4-HNE é conhecida por possuir uma das maiores eficiências catalíticas das GST com qualquer substrato (BRUNS, 1999; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; HUBATSCH; RIDDERSTRÖM; MANNERVIK, 1998; SHIREMAN *et al.*, 2010). A arginina 15 das GSTs da classe alfa de mamíferos, quando voltada ao sítio catalítico fica próximo a carbonila do 4-HNE e o modo particular dessa interação determina a especificidade da conjugação com este substrato (AWASTHI, 2006). O 4-HNE é um dos principais produtos da peroxidação lipídica e estudos propõem que as GSTs da classe alfa podem ter atividade de glutathione peroxidase e de proteção contra o estresse oxidativo de produtos como o hidroperóxido de cumeno (CHP), regulando as suas concentrações intracelulares (AWASTHI *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 1999). A atividade de glutathione peroxidase independente de selênio foi inicialmente descrita em ratos por LAWRENCE; BURK, (1976). Após anos outros estudos foram realizados em diversos animais vertebrados sendo possível identificar a atividade de glutathione peroxidase de GSTA com o substrato CHP como, por exemplo, em peixes (KONISHI *et al.*, 2005; MARTINEZ-LARA; LEAVER; GEORGE, 2002). As GSTs não utilizam peróxido de hidrogênio como substrato, mas podem catalisar a redução dependente de GSH de hidroperóxidos não fisiológicos, como CHP e hidroperóxidos de t-butil. Essa atividade foi estabelecida até agora em vertebrados como exclusiva da classe alfa das GSTs, o que sugere um possível papel fisiológico desta classe fornecendo defesa antioxidante (AWASTHI, 2006; YANG *et al.*, 2001).

Em vertebrados também foi caracterizada a atividade de isomerase para a classe alfa, na síntese de hormônios esteroides, como testosterona e progesterona (DOURADO *et al.*, 2014; HALLMANN *et al.*, 2019; JOHANSSON; MANNERVIK, 2001; LINDSTRÖM *et al.*, 2018; PETTERSSON). Apesar de hormônios esteroides, como estradiol, progesterona e testosterona já terem sido identificados em bivalves, maiores detalhes sobre seu mecanismo de ação e origem ainda não são conhecidos (GOSLING, 2015; LAFONT; MATHIEU, 2007). A presença de esteroides de vertebrados em moluscos não pode ser considerada como uma evidência confiável de biossíntese endógena ou de um papel endócrino (SCOTT, 2012; SCOTT, 2013). Estudos

recentes apontam que invertebrados possuem a habilidade de absorver esses esteroides de vertebrados da água, o que aumenta a possibilidade de que estes sejam de origem exógena (FODOR, 2020; SCOTT, 2018).

A classe alfa de GSTs já foi bem caracterizada em humanos (COLES; KADLUBAR, 2005). Existem estudos sobre GSTA em mamíferos como: equinos (LINDSTRÖM *et al.*, 2018), porcos (FEDULOVA; RAFFALLI-MATHIEU; MANNERVIK, 2011) e macacos (WANG *et al.*, 2002), também em peixes (KONISHI *et al.*, 2005) e aves (KIM *et al.*, 2011). Porém quando direcionado ao grupo dos invertebrados as informações são mais escassas. A GST da classe alfa já foi identificada em alguns moluscos, como o caso da amêijoia *Ruditapes decussatus* (HOARAU *et al.*, 2002) e no mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (WANG *et al.*, 2013). No entanto, ainda não há informações acerca de ostras, tais como a *C. gigas*, evidenciando a necessidade e relevância do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar estrutural e funcionalmente a Glutathione *S*-transferase alfa 1.2 recombinante, de ostra *C. gigas*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a proteína estruturalmente por modelagem tridimensional e *docking* molecular com a glutathione reduzida (GSH) e com substratos, como 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) e hidroperóxido de cumeno (CHP).
- Expressar e purificar a isoforma GSTA.1.2 recombinante (rGSTA);
- Avaliar a cinética enzimática de rGSTA.1.2 com os substratos CDNB e CHP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO*

3.1.1 SEQUÊNCIA

A sequência nucleotídica identificada pelo grupo de pesquisa do LABCAI através da publicação do genoma de *C. gigas* foi utilizada para se inferir a sua sequência aminoacídica de CgGSTA1.2 que está anotada com o código de acesso: XP_034334320.1. A sequência está disponível no banco de dados do NCBI com identificação realizada de forma automatizada: MAKVLAKMAHLTYFNNGRGRGEVIRMMMLAAAKIPFTETFLTERQPFEKLIQDGLLPFK QVPLLKIDDMELVQTGAIVRYVAKKGGMYGADDKEATMIDMYYEASRDFYSKFLP VLFMKTEEQAVKDAKAAGEDKYFPALEKRLKETGSGYLLGTSLTMADVGFLEVLLL CVEFGGDDFLDDHSDVKQYYQRLVATPLMAEFLKSPFRKRKNDEQYIKEVKRVLNR E

O *software online* ExPASy ProtParam tool (GASTEIGER *et al.*, 2005) foi utilizado para analisar a sequência de CgGSTA1.2 e fazer uma previsão dos parâmetros físico-químicos para a proteína. Para avaliar a sequência alvo e seu nível de semelhança de resíduos de aminoácidos conservados foi realizado um alinhamento com as sequências de outras espécies no *software online* MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (EDGAR, 2004).

As espécies para o alinhamento foram selecionadas através de uma busca por BLASTp - Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (CAMACHO *et al.*, 2009) por nível de maior identidade com a sequência de *C. gigas* possíveis de serem encontradas, que obtiveram valores de 49,53 a 41,71% de identidade. Sendo esses oito organismos selecionados: *Branchiostoma belcheri*, (XP_019617294.1), *Mytilus edulis* (CAG2194334.1), *Mytilus galloprovincialis* (UEP55608.1), *Gigantopelta aegis* (XP_041354738.1), *Candidula unifasciata* (CAG5126737.1), *Plakobranchus ocellatus* (GFO11502.1), *Elysia chlorotica* (RUS74747.1) e *Homo sapiens* (NP_665683.1). A sequência humana foi adicionada na análise por motivo de comparação devido a ter uma sequência já bastante conhecida. O MUSCLE foi utilizado também para realizar cálculos dos valores de identidade contra todas as sequências de GSTA dos organismos selecionados. Adicionalmente foi realizada uma análise separando as sequências aminoacídica em seus sítios G e H e foi executado um novo cálculo de identidade entre as sequências de GSTA. As imagens do

alinhamento foram construídas através do programa Jalview (<https://www.jalview.org>) (WATERHOUSE *et al.*, 2009).

3.1.2 MODELO TRIDIMENSIONAL

A modelagem tridimensional da proteína foi realizada utilizando o I-TASSER *online server* (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) que prediz a estrutura da proteína pelo método de *threading*, fragmentando a sequência de entrada e realizando alinhamentos com moldes, ou templates, semelhantes à sequência de entrada (ZHANG, 2008). A escolha do modelo predito pelo *software* foi realizada com base na medida quantitativa de confiança pelo escore de confiança (C-score) com valores aceitos entre -5 e 2 (YANG; ZHANG, 2015). Também foram avaliados valores de TM-score maiores que 0,5 indicando modelo de topologia correta e valores de RMSD de até 2Å (ZHANG; SKOLNICK, 2004). Uma ferramenta adicional foi utilizada para garantir a qualidade do modelo, ProSA-web - Protein Structure Analysis (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) que se trata de um *software online* para reconhecer erros nas estruturas tridimensionais de proteínas, calculando uma pontuação de qualidade geral para o modelo (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

O *software online* HADDOCK (*High Ambiguity Driven protein-protein Docking*) (<https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/>) foi utilizado para formar dímeros com a união dos monômeros resultantes do I-TASSER. O *docking* proteína-proteína teve sua qualidade avaliada pelos valores de HADDOCK-score e RMSD de até 2Å com a sobreposição dos modelos realizada no UCSF Chimera (DOMINGUEZ; BOELEN; BONVIN, 2003; PETERSEN *et al.*, 2004; VAN ZUNDERT *et al.*, 2016; VRIES; VAN DIJK; BONVIN, 2010). Para assegurar a qualidade do modelo predito foram utilizados métodos adicionais aos parâmetros já fornecidos pelo programa de modelagem como o plot de Ramachandran, utilizado por meio do Ramachandran Plot Server (<https://zlab.umassmed.edu/bu/rama/>) para avaliar os ângulos de torção da proteína (ANDERSON *et al.*, 2005).

3.1.3 DOCKING MOLECULAR

Com o modelo tridimensional construído e com a qualidade garantida para a isoforma CgGSTA1.2, foi executada a predição do atracamento, ou *docking* molecular com a molécula de glutationa reduzida (GSH) e com substratos conhecidos na literatura como CDNB (1-Cloro-

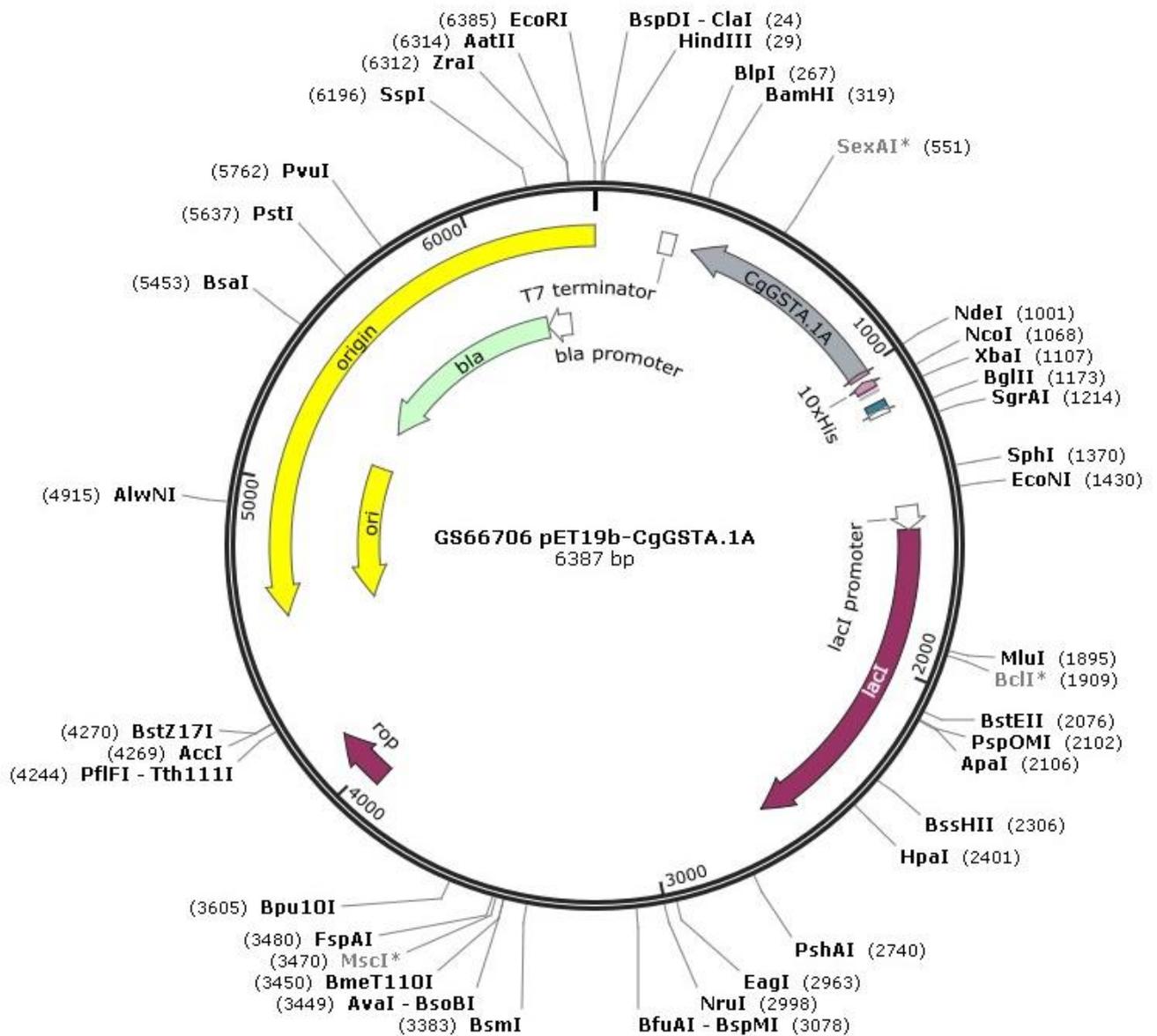
2,4-dinitrobenzeno) e hidroperóxido de cumeno (CHP). Essas análises foram elaboradas utilizando o SwissDock (<http://swissdock.ch>), com parâmetro de cadeia lateral flexível de 3Å em torno do ligante e modo *accurate*. O *software online* realiza a predição das interações moleculares da proteína de interesse e um ligante (BITENCOURT-FERREIRA; AZEVEDO, 2019; GROSDIDIER; ZOETE; MICHELIN, 2011). As estruturas dos ligantes foram obtidas através de pesquisas no PDB (Protein Data Bank) e os *softwares* UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004) e PyMOL (SCHRÖDINGER; DeLANO, 2020) foram utilizados para preparação dos arquivos dos ligantes, quando necessário, e na avaliação das poses resultantes do *docking*. No caso do ligante CHP, este foi retirado do PubChem (KIM *et al.*, 2015), que se trata de um é um repositório público de informações sobre substâncias químicas e suas atividades biológicas, pois o PDB não possui modelos experimentais para esta substância. Os resultados dos atracamentos foram escolhidos através de comparação das posições de encaixe no bolsão de ligação com estruturas cristalográficas referência disponíveis no PDB e segundo valores de ΔG baseados nos valores apresentados no *redocking* da estrutura referência como forma de controle. Além dos parâmetros de valores fornecidos pelo programa de *docking*, a qualidade do encaixe do ligante foi também avaliada através do valor de RMSD da pose de encaixe contra as estruturas similares disponíveis no PDB por meio do programa *online* DockRMSD (<https://zhanggroup.org/DockRMSD/>) (BELL; ZHANG, 2019) para comparar com sobreposições dos ligantes do *docking* e da estrutura experimental do PDB no UCSF Chimera. Complementarmente, o *docking* foi avaliado pelo *software* LigPlot (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011) que realiza diagramas 2D a partir das coordenadas 3D obtidas do *docking* onde é possível a visualização de ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos.

3.2 ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO*

O gene *CgGSTA.1.2* foi sintetizado pela empresa GenOne ([Figura 3](#)) em vetor de expressão pET-19b que confere a proteína alvo uma cauda contendo 10 histidinas (His Tag) de seguinte sequência: MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKH na porção N-terminal. O vetor também possui um gene de resistência à ampicilina, uma região que codifica para um sítio de clivagem da cauda de histidinas pela enzima enterocinase e otimização de códons para expressão em *E. coli*. O vetor de expressão é construído para que um gene possa ser transcrito e traduzido, contendo todos os componentes de expressão para genes exógenos (GILEADI,

2017; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). A cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Promega) $>10^6$ cfu/ μ g contendo resistência ao antibiótico cloranfenicol foram utilizadas como hospedeiras para expressão da proteína.

Figura 3. Mapa do vetor de expressão para o gene *CgGSTA1.2* disponibilizado pela empresa GenOne.



3.2.1 BACTÉRIAS CÁLCIO COMPETENTES

As células bacterianas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS foram preparadas antes da transformação utilizando cloreto de cálcio. Uma amostra estoque de BL21 (DE3) pLysS foi estriada em meio de cultura Luria Bertani (LB) ágar (contendo cloranfenicol 34 mg/ml) com crescimento durante a noite, a 37°C. No dia seguinte uma colônia isolada foi inoculada com 5 ml de meio de cultura líquido LB broth (cloranfenicol 34 mg/ml) com crescimento durante a noite, a 37°C sob agitação. No dia 3 foi inoculado 6 µl/ml (300 µl em 50 ml) do pré-inóculo, em meio líquido LB broth (cloranfenicol 34mg/ml) e cresceu por 2h30 sob agitação a 37°C até atingir a densidade óptica (D.O.) de 0,4 a 600 nm. O meio de cultura foi centrifugado a 4.000 rpm (centrífuga - Eppendorf 5804 R) por 10 minutos a 4°C, descartando o sobrenadante e adicionando 25 ml de CaCl₂ (0,1 M) gelado e incubando por 1 h em gelo. O sedimento foi ressuspensionado em agitador do tipo vórtex e centrifugado novamente a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado por vórtex em 3 ml do tampão de congelamento (CaCl₂ 0,1 M + 10% glicerol) (CHAN *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2017).

3.2.2 TRANSFORMAÇÃO

As células bacterianas passaram pelo protocolo de transformação, com a finalidade de incorporar o DNA plasmidial exógeno construído, lhe conferindo habilidade de produção da proteína de interesse. Foi adicionado 0,5µl do DNA plasmidial (100 ng/µl) sintetizado pela GenOne nas células competentes que foram incubadas por 30 minutos em gelo. Após foi realizado um choque térmico em banho-maria a 42°C por 1 minuto com retorno ao banho de gelo por 2 minutos. Então foi adicionado 500 µL de meio de cultura líquido LB Broth e incubado a 37°C com agitação por 1h30. Por fim adicionou-se 150 µl da cultura crescida em placa de meio de cultura sólido contendo meio LB ágar com ampicilina (100 mg/ml) e cloranfenicol (34 mg/ml) e foi incubada a 37°C *overnight* (adaptado de FROGER; HALL, 2007).

3.2.3 EXPRESSÃO

Para a expressão da proteína foi selecionada uma colônia isolada resistente aos antibióticos que cresceu em placa com meio sólido. A colônia foi então transferida para crescer em meio de cultura líquido (LB Broth) contendo ampicilina e cloranfenicol, onde ficou em incubação *overnight* a 37°C, sob agitação. No segundo dia foi utilizado o meio crescido na proporção 1,5 ml de pré-inoculo para 250 ml de meio líquido novo que cresceu a 37°C, em agitação até atingir a DO de 0,6 medindo a absorbância a 600 nm. Então foi adicionado o indutor IPTG 1 mM (concentração final) e crescido por 3 horas a 37°C, os parâmetros foram baseados em trabalhos anteriores do grupo do LABCAI em dados ainda não publicados (VILAS-BÔAS, 2022). Antes da adição do IPTG, foi retirada uma alíquota (T0) e após adição, a cada hora até o final da indução (T1, T2 e T3), para realizar o gel de eletroforese da expressão da proteína. Após três horas de incubação o meio de cultura foi centrifugado por 15 minutos, a 4000 rpm, a 4°C, descartado seu sobrenadante e o sedimento foi congelado até a purificação (BANEYX, 1999; HANAHAN, 1983).

3.2.4 PURIFICAÇÃO

A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC) utilizando coluna de níquel (GE Healthcare HisTrap HP) com afinidade por histidina em equipamento FPLC - (fast protein liquid chromatography) ÄKTA purifier. Para tal, o sedimento congelado após a expressão foi diluído em tampão lise contendo 50mM TRIS, 250mM NaCl, 0,5mM Ditioneitol (DTT), 10 mM de imidazol, 15% de glicerol e pH 8. Para o rompimento das células bacterianas foi utilizado um ultrasonicador por 5 minutos, ciclos/pulsos de 30s e amplitude 34%, após centrifugação a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado. Para a purificação foi utilizado tampão contendo 50mM TRIS, 250mM NaCl, 0,5mM DTT, 15% de glicerol e pH 8. A proteína foi eluída da coluna por adição de concentração crescente de imidazol no sistema até um máximo de 500 mM (BORNHORST; FALKE, 2000; LOUGHRAN; BREE; WALLS, 2016). As frações coletadas foram congeladas e alíquotas de 20 µl foram separadas para avaliação da qualidade da purificação por dodecil sulfato de sódio - poliacrilamida gel eletroforese (SDS-PAGE) 10% utilizando kit TGX Stain Free FastCast™ da Bio-Rad. A tecnologia *stain free* utiliza a capacidade de certos resíduos de aminoácidos

aromáticos de sofrer reações químicas específicas quando expostos à radiação UV. Especificamente, o triptofano reage com certos compostos presentes no kit, que emite fluorescência (GILDA; GOMES, 2013). Apesar da tecnologia presente, para realizar a imagem do gel, este foi corado com azul de coomassie (coomassie brilliant blue) para a visualização das bandas de proteína devido a GSTA não possui o aminoácido triptofano em sua constituição.

Os marcadores moleculares utilizados foram o *unstained* (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards - Bio-Rad) que apresentam uma amplitude entre 250 e 10 kD e o *rainbow* (Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker - GE Healthcare), entre 225 a 12 kDa.

3.2.5 DIÁLISE

As frações coletadas da purificação com a presença de proteína em maior quantidade e pureza avaliadas pelo SDS-PAGE, passaram pelo processo de diálise com o objetivo de retirar o imidazol da amostra para posteriores testes cinéticos. Foi utilizado tampão contendo 50 mM TRIS, 350 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 15% glicerol para se aproximar as concentrações do tampão de purificação da proteína e protegê-la de uma possível precipitação. Onde 1ml de amostra purificada foi adicionada ao tubo de diálise - PlusOne Mini Dialysis Kit (GE Healthcare) com membrana de 1 kDa de cut-off. O tubo ficou em 1 L de tampão overnight sob agitação em geladeira. No dia seguinte a amostra passou pela segunda etapa da diálise com mais 1 L de tampão novo, por 3 horas sob agitação em geladeira (PESARRODONA; UNZUETA; VÁSQUEZ, 2014). O conteúdo de proteína obtido foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A curva padrão foi executada utilizando como padrão de proteína o Bovine Serum Albumin (BSA) em concentrações de 0,1 0,2 0,3 e 0,4 mg/ml em tampão da diálise. As leituras foram realizadas a 595 nm em espectrofotômetro (Spectramax M5).

3.2.6 TESTE DE ATIVIDADE

A proteína recombinante produzida, purificada e dialisada ainda com cauda polihistidina passou por testes cinéticos. A atividade de glutathione transferase foi avaliada com o substrato CDNB com protocolo adaptado de (HABIG *et al.*, 1974). O ensaio foi realizado em duplicatas sendo utilizados 1, 2,5 e 5 µl de proteína recombinante (concentração de 0,372 µg/µl) foram incubadas por 5 minutos a 30°C com 1 mM GSH em tampão fosfato 100 mM. Depois

foram adicionados 100 μl de CDNB 1 mM (concentração final em etanol 5%) e leituras foram registradas por 5 minutos a 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) em espectrofotômetro (Spectramax M5), os valores foram descontados do branco (tampão da diálise). A atividade está apresentada em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

Para determinação da constante de Michaelis-Menten (k_m) e velocidade máxima (V_{max}) para o substrato CDNB foi realizada uma curva de saturação com concentração crescente do substrato (0,0014 - 2,5 mM) em 5% de etanol, na presença de uma concentração fixa de GSH (2,5 mM) com 2,7 μl de amostra ($\cong 1 \mu\text{g}$ de proteína). Na curva de saturação relativa à GSH foram utilizados valores crescentes de GSH (0,0048 – 5 mM) na presença de uma concentração fixa de CDNB (2,5 mM) a 5% de etanol.

A atividade da glutathione peroxidase foi determinada por meio da metodologia descrita por MANNERVIK; JEMTH, 2002 onde a oxidação do NADPH ($\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a partir da redução do substrato hidroperóxido de cumeno (CHP) foi monitorada a 340 nm por 5 minutos, a 25 °C. O meio de reação foi composto por NADPH 0,1 mM, GR 1 U/ml, GSH 1 mM, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, hidroperóxido de cumeno 1,5 mM ou 3 mM (em 95% etanol), com 10 μl de amostra. A atividade está apresentada em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, segundo cálculos da equação 1.

Para a determinação da constante de Michaelis-Menten (k_m) e velocidade máxima (V_{max}) foi utilizada uma concentração crescente de CHP (0,25 - 32 mM) em concentração fixa dos demais compostos, NADPH 0,3 mM, GR 1 U/ml, GSH 1 mM em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 e 10 μl de amostra. As concentrações mencionadas nos ensaios correspondem à concentração final na reação. Os parâmetros de Michaelis-Menten (k_m e V_{max}) foram calculados utilizando o *software* GraphPad Prism 9.

Equação 1. Equação para cálculos da cinética enzimática.

$$atividade = \left(\frac{\left(\frac{abs/min}{\epsilon} \times volume\ total \right)}{([proteína] \times volume\ de\ amostra)} \right) \times dil$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *IN SILICO*

4.1.1 SEQUÊNCIA

A sequência de aminoácidos de CgGSTA1.2 (código NCBI: XP_034334320.1) foi analisada em detalhes pelo ProtParam com a finalidade de prever condições e características únicas da proteína alvo. Quando investigada, a proteína apresentou 225 resíduos de aminoácidos, uma massa teórica de 25759.98 Da (\cong 26 kDa) e um pI de 6.77. Contudo, quando se considera também a cauda poli-histidina ligada à proteína após a clonagem em vetor de expressão pET19b, com finalidade de auxiliar na purificação, ela passa a contar com 248 resíduos de aminoácidos e a sua massa teórica prevista é de 28526.81 Da (\cong 28 kDa) com um pI de 6,53. Valores de ponto isoelétrico (pI) e massa previstos são importantes para planejar as atividades *in vitro* que fazem parte deste estudo (NELSON; COX, 2014). O índice de instabilidade da proteína exibiu valores de 32.11 sem cauda e 32.26 com cauda poli histidina, de acordo com a análise realizada pelo ProtParam. Este índice é baseado no tempo de meia vida da proteína *in vivo* e prevê por meio de cálculos de correlação entre a formação de dipeptídeos e o comprimento de sequência, baseados na estrutura primária da proteína, um valor para distinguir proteínas estáveis de instáveis. O índice aponta que valores maiores que 40 indicam proteínas instáveis, abaixo de 40, proteínas mais estáveis (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990). Diante disso, os valores previstos para CgGSTA1.2 indicam uma proteína estável. Isso pode indicar que as análises de atividades *in vitro* com a proteína sejam facilitadas, quando comparadas a outra isoforma de GST estudada pelo LABCAI que teve este índice acima de 40 e seus experimentos *in vitro* foram complexos, necessitaram de mais etapas e cuidados com as formulações de tampões e manuseio da proteína recombinante (VILAS-BÔAS, 2022).

4.1.2 ALINHAMENTO

Com o intuito de observar similaridades entre sequências de GSTs alfa de diferentes animais, foi realizado um alinhamento no programa *online* MUSCLE a fim de buscar resíduos

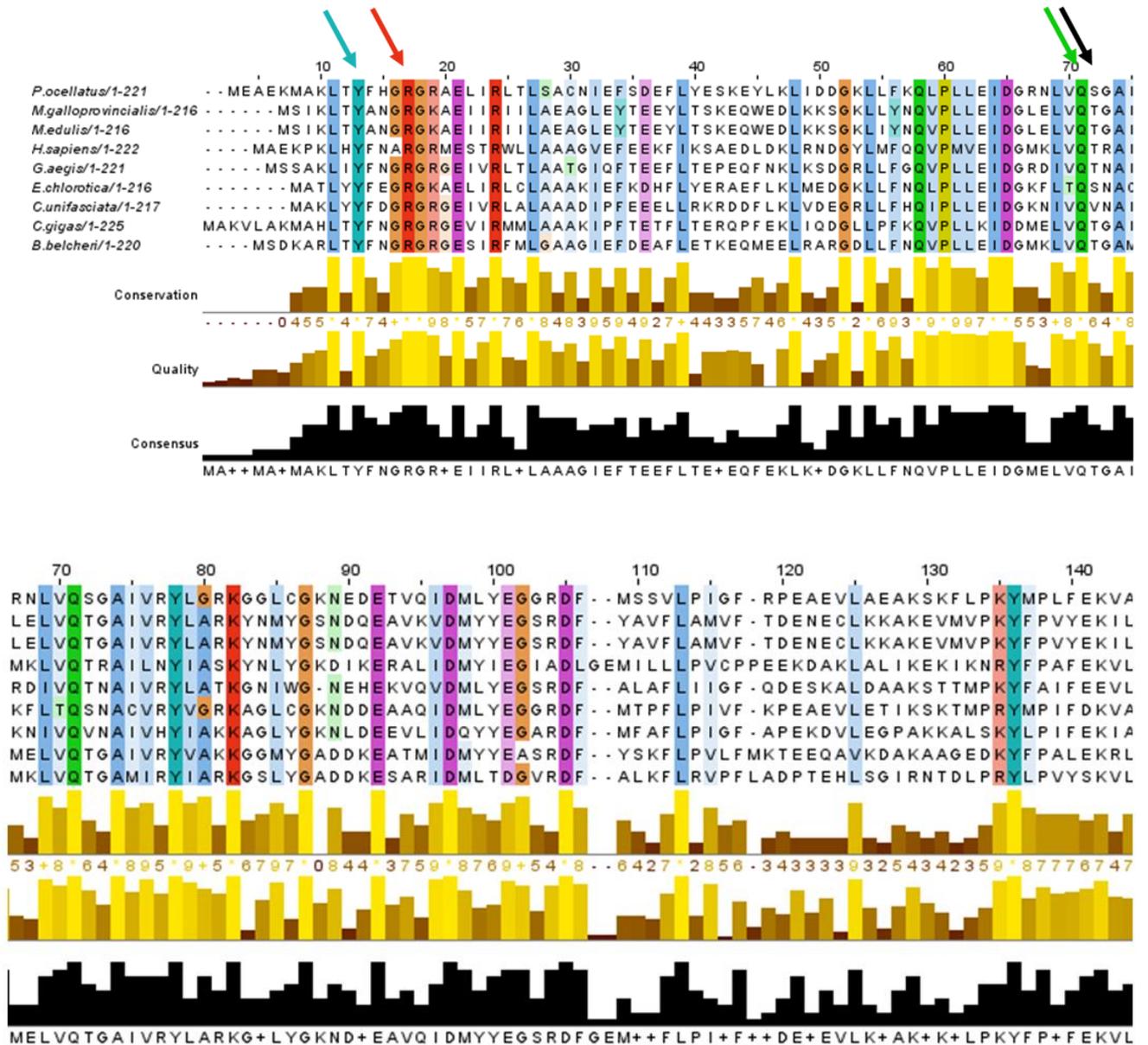
de aminoácidos conservados entre as espécies e entender melhor a sequência alvo estudada. Os organismos foram escolhidos utilizando a sequência aminoacídica CgGSTA1.2 como entrada e por meio de uma busca por BLASTp foram selecionados os organismos com maiores valores de identidade com a sequência de *C. gigas*. Oito organismos foram escolhidos para o alinhamento: *Homo sapiens*, *Branchiostoma belcheri*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Gigantopelta aegis*, *Candidula unifasciata*, *Plakobranhus ocellatus*, *Elysia chlorotica*.

O alinhamento realizado no MUSCLE ([Figura 4](#)) exibe os resíduos de aminoácidos das sequências de GSTA completas e seu nível de conservação em colunas destacadas coloridas. Em evidência a região N-terminal da proteína, onde estão apontados por setas coloridas os aminoácidos conhecidos pela interação com a molécula de glutatona reduzida.

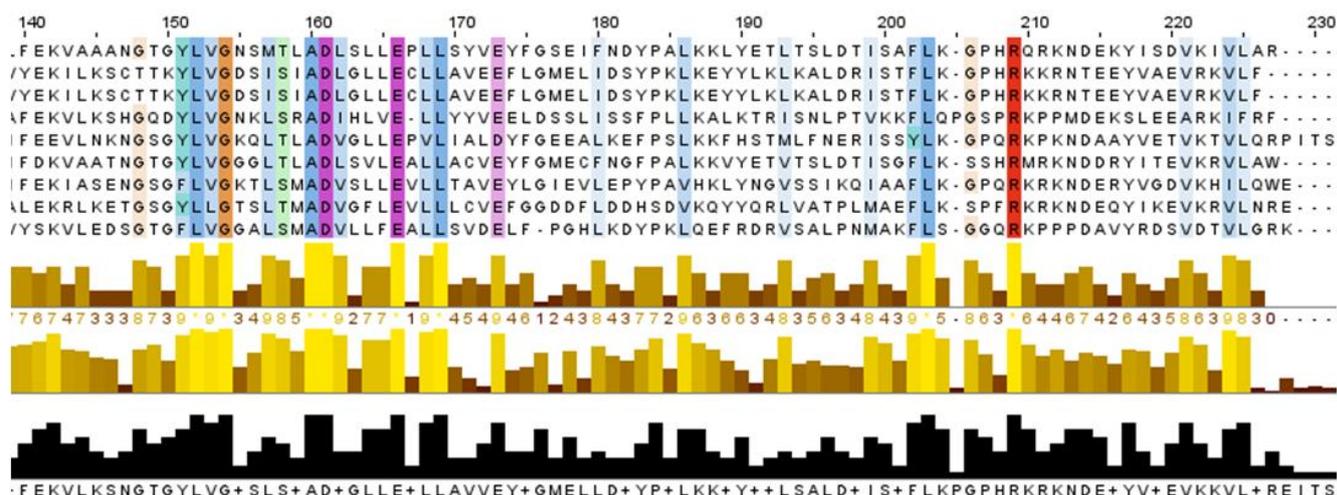
A região de estrutura mais conservada nas GSTs citosólicas é o domínio N-terminal, onde se localiza o motivo $\beta\beta\alpha$ que é responsável pelo reconhecimento do tripeptídeo GSH (MFEKA *et al.*, 2020). As classes mi, pi, sigma e alfa possuem um resíduo de tirosina essencialmente para ativação da molécula de glutatona. Na maioria das GSTs a hidroxila de uma tirosina (Y9) N-terminal se liga ao enxofre da glutatona reduzida ([Figura 5](#)) (THORSON *et al.*, 1998; DOURADO *et al.*, 2010).

Em algumas classes da enzima essa tirosina pode ser substituída por uma cisteína ou por uma serina, como na classe teta, por exemplo (AWASTHI, 2006; GILDENHUYS *et al.*, 2010). A Y9 (posição 9 em mamíferos), equivalente a Y13 em CgGSTA1.2 (Y na posição 13 para *C. gigas*) ([Figura 4](#), seta azul), é possível observar sua conservação, como também para todas as sequências analisadas no alinhamento. No entanto, nas GSTs da classe alfa existe mais uma interação secundária de um nitrogênio da R15 (posição 15 para mamíferos) ([Figura 5](#)) que adicionalmente ajuda a estabilizar o tiol da GSH (AWASTHI, 2006).

Figura 4. Alinhamento das seqüências de GST da classe alfa de diferentes espécies: *Plakobranchus ocellatus*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis*, *Homo sapiens*, *Gigantopelta aegis*, *Elysia chlorotica*, *Candidula unifasciata*, *C. gigas* e *Branchiostoma belcheri* realizado no programa MUSCLE. Imagem gerada por meio do software Jalview. Setas indicam os resíduos de aminoácidos conservados conhecidos por estarem envolvidos na ligação com a molécula de GSH.

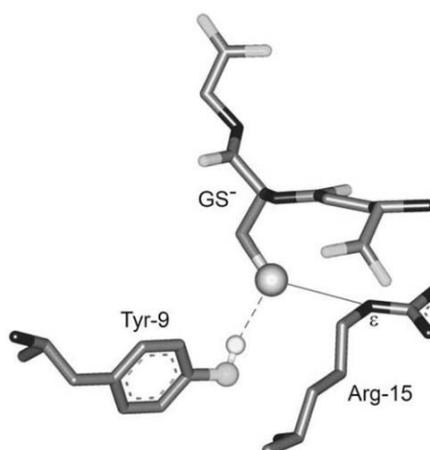


Continua...



A arginina 17 presente em CgGSTA1.2 é um aminoácido conhecido por ser muito conservado entre as GSTs da classe alfa, o que foi possível observar no alinhamento executado ([Figura 4](#), seta vermelha). O seu grupo catiônico guanidino pode desempenhar um papel na catálise e na interação com o ligante. Estudos realizaram mutações nesse aminoácido em GSTA de humanos e foi observado que na troca desse resíduo pode haver prejuízo na atividade catalítica da enzima, não afetando, porém, a sua afinidade pela GSH. O seu envolvimento na ligação e ativação da glutatona é uma das características que distingue a GST alfa das demais classes (BJÖRNSTEDT *et al.*, 1995; DOURADO *et al.*, 2010; GILDENHUYS *et al.*, 2010).

Figura 5. Interações da molécula de glutatona (GS^-) com os resíduos de aminoácidos Y9 e R15 específico da classe alfa das GSTs em mamíferos.



Fonte: (AWASTHI, 2006).

Outros aminoácidos conservados entre as espécies envolvidos na ligação com a GSH conhecidos para a classe alfa de humanos são Q67 e T68. O resíduo de glutamina (seta verde, [Figura 4](#)) da proteína faz uma ligação de hidrogênio com a glutatona por meio do oxigênio de sua amida. Já na treonina, (seta preta, [Figura 4](#)), um resíduo de aminoácido menos conservado entre as espécies avaliadas no alinhamento, seu nitrogênio faz uma ligação de hidrogênio com a GSH, quando avaliados em estruturas cristalográficas de mamíferos (AWASTHI, 2006; SINNING *et al.*, 1993).

O MUSCLE também realiza o cálculo de identidade entre todas as sequências que foram utilizadas para o alinhamento, e reporta as informações em forma de percentual. As identidades de todas as espécies contra todas estão apresentadas na [Tabela 1](#) com destaque em cinza para valores contra *C. gigas*.

Tabela 1. Percentual de identidade entre as GSTA de todas as espécies do alinhamento: *Homo sapiens*, *Branchiostoma belcheri*, *C. gigas*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Gigantopelta aegis*, *Candidula unifasciata*, *Plakobranthus ocellatus* e *Elysia chlorotica*, criada pelo MUSCLE.

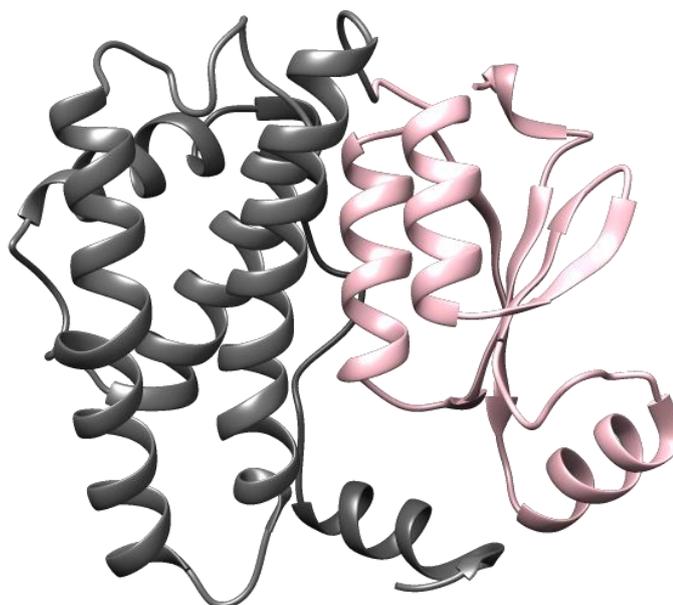
	<i>H. sapiens</i>	<i>B. belcheri</i>	<i>C. gigas</i>	<i>M. edulis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>G. aegis</i>	<i>C. unifasciata</i>	<i>P. ocellatus</i>	<i>E. chlorotica</i>
<i>H. sapiens</i>	100.00	43.12	37.90	40.47	40.47	36.11	39.07	38.99	37.22
<i>B. belcheri</i>	43.12	100.00	45	44.65	45.12	45.16	42.59	42.66	42.79
<i>C. gigas</i>	37.90	45	100.00	48.61	48.61	46.79	47.93	47.96	47.22
<i>M. edulis</i>	40.47	44.65	48.61	100.00	99.54	48.84	41.86	48.15	45.12
<i>M. galloprovincialis</i>	40.47	45.12	48.61	99.54	100.00	49.30	42.33	48.61	45.58
<i>G. aegis</i>	36.11	45.16	46.79	48.84	49.30	100.00	52.31	54.38	49.77
<i>C. unifasciata</i>	39.07	42.59	47.93	41.86	42.33	52.31	100.00	56.48	54.17
<i>P. ocellatus</i>	38.99	42.66	47.96	48.15	48.61	54.38	56.48	100.00	70.83
<i>E. chlorotica</i>	37.21	42.79	47.22	45.12	45.58	49.77	54.17	70.83	100.00

Os valores de identidade obtidos - entre 48,61% e 37,90% - mostraram que a maior identidade está entre os organismos mais próximos evolutivamente a *C. gigas*, *M. edulis* e *M. galloprovincialis*, por se tratar de moluscos bivalves. O valor de menor identidade é com o

organismo *H. sapiens*, uma espécie bem distinta de *C. gigas*. Apesar disso, GST alfa de *H. sapiens* foi inserida na avaliação como forma de comparativo devido a se tratar de uma enzima com diversos estudos de caracterização já publicados, e da escassez de estudos com outras espécies mais próximas evolutivamente de *C. gigas*.

As GSTs têm sua estrutura proteica dividida em dois domínios. O domínio N-terminal conta com o sítio de ligação com a GSH em seu motivo característico derivado da tiorredoxina ($\beta\alpha\beta\alpha\ \beta\beta\alpha$), chamado também de sítio G, evidenciado na cor rosa na [Figura 6](#).

Figura 6. Modelo tridimensional monomérico de CgGSTA realizado no I-TASSER, evidenciando os diferentes sítios da proteína: em rosa o sítio G e em cinza sítio H. A imagem foi obtida no UCSF Chimera.



Já o domínio C-terminal, que constitui dois terços da proteína, possui o sítio de ligação com os substratos eletrofílicos, chamado de sítio H, demonstrado na cor cinza na [Figura 6](#). Dessa forma assemelha-se ao previsto na literatura para espécies de GST alfa, em mamíferos (ARMSTRONG, 1997; AWASTHI, 2006; FROVA, 2006; KALITA *et al.*, 2017; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

A fim de avaliar a conservação dos dois sítios (G e H) da proteína estudada, foi executada uma comparação entre as suas identidades fragmentando as sequências utilizadas no alinhamento. Foi possível observar nos resultados da [Tabela 2](#) que o sítio G demonstra-se mais

conservado, como o esperado, corroborando com a literatura sobre GSTA de humanos (AWASTHI, 2006). O sítio G possui valores mais altos de identidade entre as sequências quando comparados aos valores para o sítio H. A média das porcentagens de identidade para o sítio G é de 55,18% quando para o sítio H é de 40,35%.

Tabela 2. Percentual de identidade de GSTs alfa das espécies do alinhamento *Homo sapiens*, *Branchiostoma belcheri*, *C. gigas*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Gigantopelta aegis*, *Candidula unifasciata*, *Plakobranthus ocellatus*, *Elysia chlorotica* contra *C. gigas* nos sítios G e H da proteína, gerado pelo MUSCLE.

	sítio G	sítio H
<i>H. sapiens</i>	47,56	32,12
<i>B. belcheri</i>	58,54	34,06
<i>M. edulis</i>	53,75	45,59
<i>M. galloprovincialis</i>	53,75	45,59
<i>G. aegis</i>	59,26	38,69
<i>C. unifasciata</i>	56,96	42,03
<i>P. ocellatus</i>	55,95	43,07
<i>E. chlorotica</i>	55,7	41,61
média	55,18	40,35

As maiores divergências entre as sequências das espécies estão localizadas nos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio H. Esse resultado reitera a importância da realização de uma curadoria manual de sequências, bem como um estudo minucioso das estruturas para seu uso e aplicação em estudos bioquímicos e cinéticos.

4.1.3 MODELOS TRIDIMENSIONAIS

Sequências de aminoácidos por seleção evolutiva apresentam essencialmente a mesma estrutura tridimensional. Para caracterizar a proteína, compreender sua estrutura e suas possíveis funções foi realizada uma predição do modelo tridimensional da enzima a partir da

sua sequência aminoacídica. O modelo pode nos permitir prever propriedades e atividades da proteína se utilizarmos como comparação dados já publicados em bancos de dados experimentais e seus testes de atividade (KUFAREVA; ABAGYAN, 2011; SILVA; BASTOS; SANTOS, 2021).

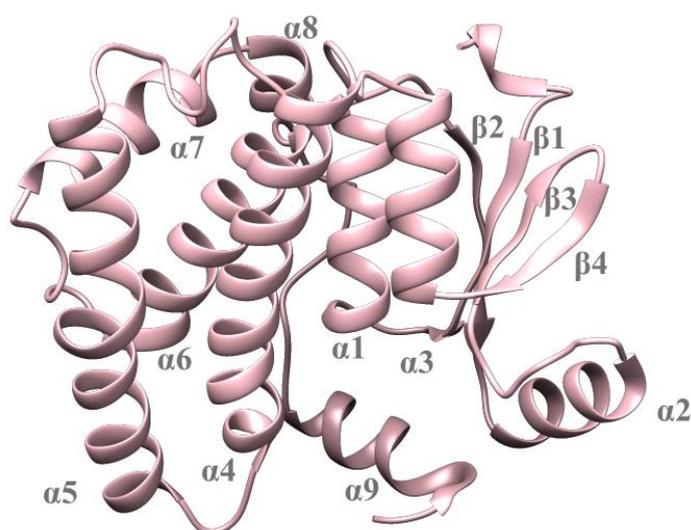
O modelo tridimensional da proteína CgGSTA1.2 foi desenvolvido pelo I-TASSER que gera o modelo total da proteína fragmentando a sequência de entrada e realizando uma busca por estruturas similares na biblioteca do PDB usando uma abordagem *meta-threading* por LOMETS (Local Meta-Threading Server). O LOMETS é um meta-servidor de segmentação local que reúne vários programas de *threading* que preveem de forma automatizada estruturas de proteínas (ZHENG *et al.*, 2019). O segundo passo do *software* é realizar o alinhamento dos fragmentos e remontá-los formando modelos de comprimento total. Quando não forem encontrados *templates* compatíveis com a sequência de entrada por LOMETS, o I-TASSER utiliza a metodologia *ab initio* baseadas em simulações de Monte Carlo, que calculam caminhos e propriedades termodinâmicas das proteínas para realizar a predição dos modelos (LOTAN; SCHWARZER; LATOMBE, 2003). Além do modelo 3D de CgGSTA1.2 foram realizados modelos e *dockings* com a GSH para as demais 16 sequências de GST citosólicas e mitocondrial de *C. gigas*, disponíveis no Apêndice A.

Cinco modelos 3D foram executados no I-TASSER para a sequência de CgGSTA1.2 com diferentes valores de C-score e o modelo de melhor resultado foi escolhido (Figura 7). O método para identificar qual modelo construído pelo *software* é mais adequado utiliza o escore de confiança (C-score), que é um valor baseado na significância dos alinhamentos e nos parâmetros das simulações de montagem da estrutura. O valor de C-score para o modelo escolhido foi de 0,63. Considerando que valores aceitos estão na faixa de -5 a 2, onde valores maiores que -1.5 indicam um modelo com topologia global correta, (YANG; ZHANG, 2015) o modelo foi considerado dentro dos padrões de qualidade.

O modelo construído também foi avaliado pela constituição de estrutura secundária em conteúdo de α -hélices e folhas- β , visto que o enovelamento de uma proteína é mais conservado do que a própria sequência de aminoácidos (ILLERGÅRD; ARDELL; ELOFSSON, 2009). Cada subunidade das GSTs possui um sítio ativo completo com sítios de ligação para glutatona e para substratos eletrofilicos, em dois domínios (Figura 6). No domínio N-terminal do modelo construído (Figura 7), é possível observar a presença de quatro folhas- β e três α -hélices. Já no domínio C-terminal estão presentes seis α -hélices na região de interação com o substrato. Também é possível constatar a presença da estrutura de α -hélice 9, que pode ser móvel e cobrir o sítio ativo, que é uma assinatura específica das GSTs da classe alfa, de forma similar a GSTA

observadas de outros animais (ARMSTRONG, 1997; FROVA, 2006; LIAO *et al.*, 2006; SINNING *et al.*, 1993).

Figura 7. Modelo monomérico tridimensional da proteína CgGSTA1.2 construído pelo I-TASSER com suas estruturas secundárias descritas e enumeradas, imagem executada no UCSF Chimera.



O programa de *docking* também organiza os valores de top 10 *threading templates* (Tabela 3) usados pelo I-TASSER por identificação na biblioteca PDB por LOMETS, onde estão os *templates* de maior significância dos alinhamentos. Ident2 é a porcentagem de identidade dos fragmentos de moldes usados para formar o modelo da proteína CgGSTA. É possível observar os cristais 1VF4 e 1VF1 como os de maiores identidades. Essas estruturas experimentais estão depositadas no PDB pela metodologia de refração de raio-x da espécie *Gallus gallus*. O PDB 1VF1 é atribuído ao modelo da proteína GSTA com uma GSH atracada e vai ser utilizado como referência também para o *docking* com a molécula da glutathiona reduzida, por isso será utilizado também como referência para as análises de *docking*. Já o 1VF4 é a estrutura da proteína GSTA sem ligantes.

Tabela 3. *Templates de threading* usados pelo I-TASSER com seus valores de identidade referentes ao modelo construído.

PDB hit	1VF4.A	1F3A.A	1B48A	2ON7	1Z19	1GUMA	19GS	6ATRA	1VF1A	1V4A
ident2	0.41	0.38	0.38	0.30	0.27	0.35	0.27	0.40	0.42	0.41

Após a simulação de montagem da estrutura, o I-TASSER usa o programa de alinhamento estrutural TM-align para combinar o primeiro modelo formado, o de melhor valor de qualidade, contra as estruturas na biblioteca do PDB. São relatadas as dez principais proteínas ([Tabela 4](#)) que têm similaridade estrutural mais próxima, ou seja, o TM-score (*template modeling score*) mais alto, para o modelo I-TASSER construído e adicionalmente são apresentados seus valores de RMSD (*root mean square deviation*) para cada estrutura (ZHANG; SKOLNICK, 2004). A [Tabela 4](#) mostra que os melhores valores de TM-score e RMSD para uma estrutura cristalográfica contra o modelo construído foi o PDB 1VF4A.

Tabela 4. *Top 10 hits* de estruturas de proteínas depositadas no PDB usados pelo I-TASSER na modelagem.

PDB hit	1VF4A	1AGSA	3IK7A	2VCVA	1EV4A	1B48B	13GSA	1GLPA	1OKTA	1B8XA
TM-score	0.949	0.944	0.942	0.940	0.940	0.939	0.828	0.827	0.826	0.824
RMSD	0.93	0.96	1.02	0.84	01.05	1.01	1.97	1.90	1.72	2.09

A qualidade do modelo construído é muitas vezes avaliada pelo desvio quadrático médio da raiz (RMSD) entre átomos equivalentes no modelo e estruturas experimentais (COUTSIAS; WESTER, 2019; KUFAREVA; ABAGYAN, 2011). O RMSD pondera as distâncias entre todos os pares de resíduos igualmente e a melhor sobreposição das estruturas é obtida quando o menor RMSD possível é alcançado. É possível calcular esse valor para todos os átomos nas estruturas ou para um subconjunto especificamente selecionado, que alinha apenas os átomos especificados (KUFAREVA; ABAGYAN, 2011; WU; WU, 2009).

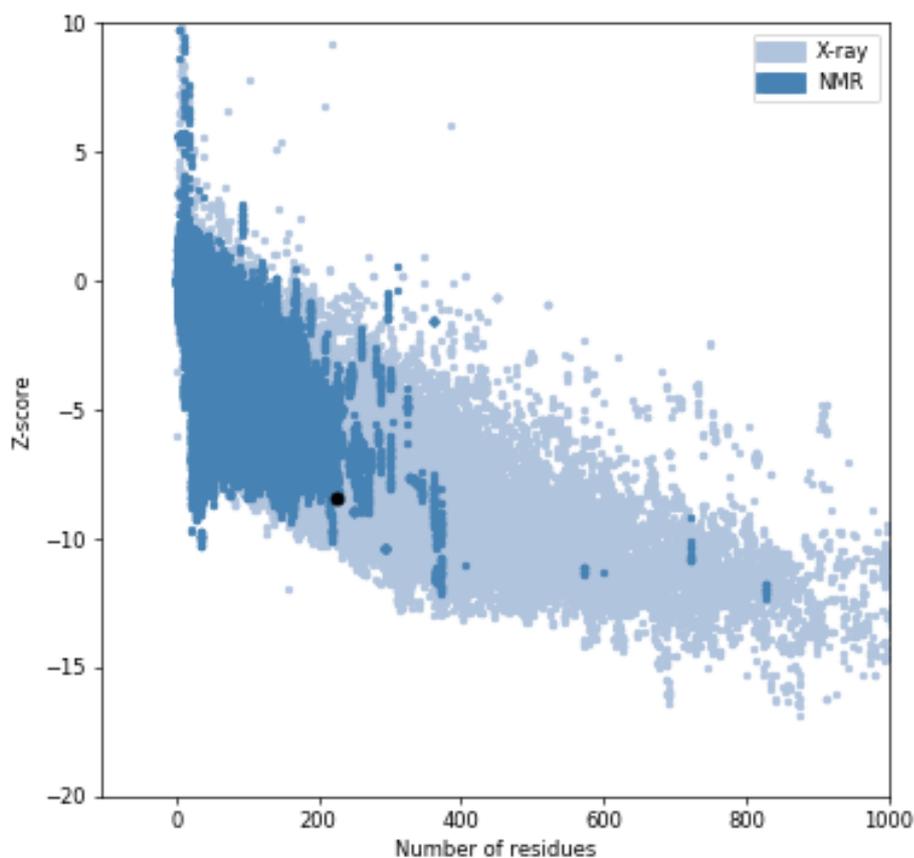
Porém o RMSD, isoladamente, não é suficiente para estimar a qualidade dos modelos porque a cobertura de alinhamento pode ser muito diferente em distintas abordagens. Com o intuito de resolver essa situação, ZHANG e SKOLNICK (2004) desenvolveram uma escala para medir a similaridade entre duas estruturas, o TM-score. Esse valor é atingido através de um cálculo que se baseia no C-score, pontuando também alinhamentos e sobreposições com

outras estruturas conhecidas. Este método é independente do tamanho da proteína, podendo ser uma melhor ferramenta na escolha de um modelo. O valor global de TM-score para o modelo escolhido dentre as opções geradas pelo I-TASSER ([Figura 7](#)) foi de 0,80. Quando comparado a estruturas depositadas no PDB ([Tabela 4](#)) 1VF4A de *G. gallus* apresenta maior TM-score de 0,949 e RMSD de 0,93Å, e é a estrutura depositada no PDB de maior identidade com CgGSTA1.2, por esse motivo foi utilizado como referência em diferentes análises neste estudo. Um TM-score > 0,5 indica um modelo de topologia correta e um TM-score < 0,17 significa uma similaridade aleatória, sendo esse o limite mínimo para considerar o modelo correto (KUFAREVA; ABAGYAN, 2011; ZHANG; SKOLNICK, 2004).

Para identificar possíveis erros na estrutura tridimensional da proteína construída pelo I-TASSER foram utilizadas algumas ferramentas extras, além dos valores de qualidade do próprio programa. O ProSA-web realiza o refinamento e a validação de estruturas experimentais e teóricas de proteínas. Esse *software online* gera pontuações e gráficos de energias para evidenciar possíveis problemas estruturais do modelo. Sua pontuação geral é calculada e exibida em um gráfico evidenciando todas as cadeias de proteínas determinadas estruturalmente disponíveis no PDB para comparação. Se a pontuação estiver fora do intervalo para proteínas nativas, então a estrutura provavelmente contém erros (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). A pontuação da qualidade geral para CgGSTA1.2 de Z-score foi = -8,39. Na [Figura 8](#), o ponto preto representa o valor para a estrutura avaliada, em azul claro estão as estruturas depositadas no PDB pelo método de raio-x e em azul escuro por NMR (ressonância magnética nuclear). Os dados são apresentados por tamanho da estrutura, número de resíduos por valor de Z-score e segundo o gráfico o modelo de CgGSTA encontra-se dentro do alcance para conformação nativa, quando comparada a outras estruturas depositadas no PDB.

O Z-score indica a qualidade geral do modelo e mede o desvio da energia total da estrutura em relação a uma distribuição de energia derivada de conformações aleatórias. Para facilitar o entendimento, o resultado está apresentado em um gráfico que mostra as proteínas determinadas experimentalmente disponíveis no PDB (KUFAREVA; ABAGYAN, 2011; SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Assim é possível observar que o modelo construído se encontra dentro da faixa de pontuação tipicamente observada para proteínas de tamanhos semelhantes. Principalmente se compararmos a valores de estruturas cristalográficas relacionadas como GSTA de *G. gallus* (PDB: 1VF1), que obteve um valor próximo (-7,74).

Figura 8. Resultado do ProSA-web onde o ponto preto representa CgGSTA, os pontos em azul claro representam todas as estruturas depositadas no PDB pela metodologia de raio-x e em azul escuro por NMR, o eixo X representa o tamanho da proteína e o eixo Y o valor de Z-score.



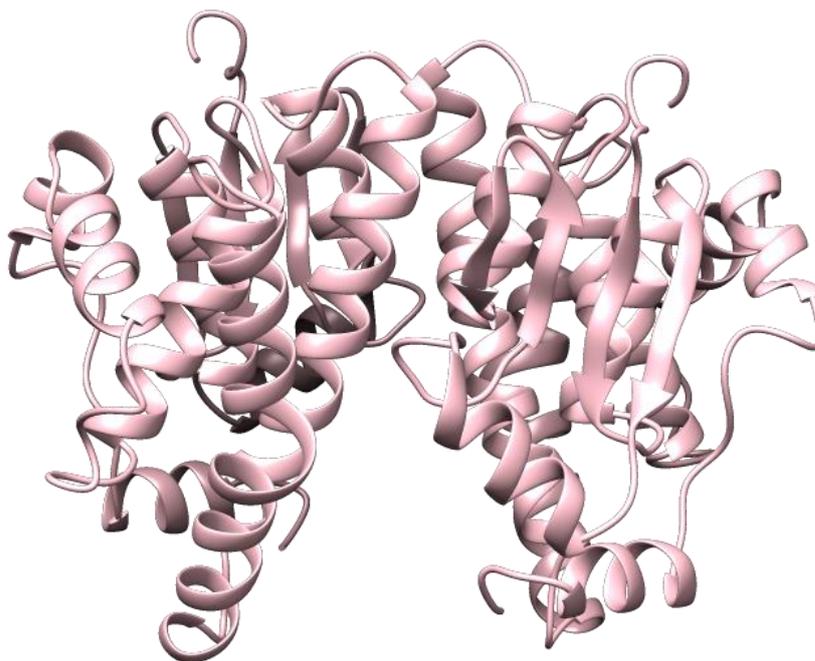
4.1.4 FORMAÇÃO DOS DÍMEROS

As GSTs são normalmente encontradas em forma dimerica. A classe alfa pode contar com proteínas homo ou heterodimericas, com isoformas dentro da sua própria classe. Para a caracterização *in silico* da proteína de interesse CgGSTA1.2 foi utilizada a forma homodimerica nas análises realizadas. O dímero foi construído ([Figura 9](#)) por meio da união do monômero gerado pelo I-TASSER utilizando o *software online* HADDOCK (*high ambiguity driven protein-protein docking*).

O HADDOCK é uma ferramenta com método de *docking* proteína-proteína onde existe a possibilidade de decidir quais resíduos de aminoácidos estarão envolvidos na interface das proteínas. Portanto, uma seleção cuidadosa dos resíduos que ficarão ativos e quais são passivos

é crítica para o sucesso do *docking* (DOMINGUEZ; BOELEN; BONVIN, 2003; VRIES; VAN DIJK; BONVIN, 2010).

Figura 9. Modelo da estrutura 3D dimérica da proteína CgGSTA1.2 construída pelo HADDOCK, imagem realizada no Chimera.

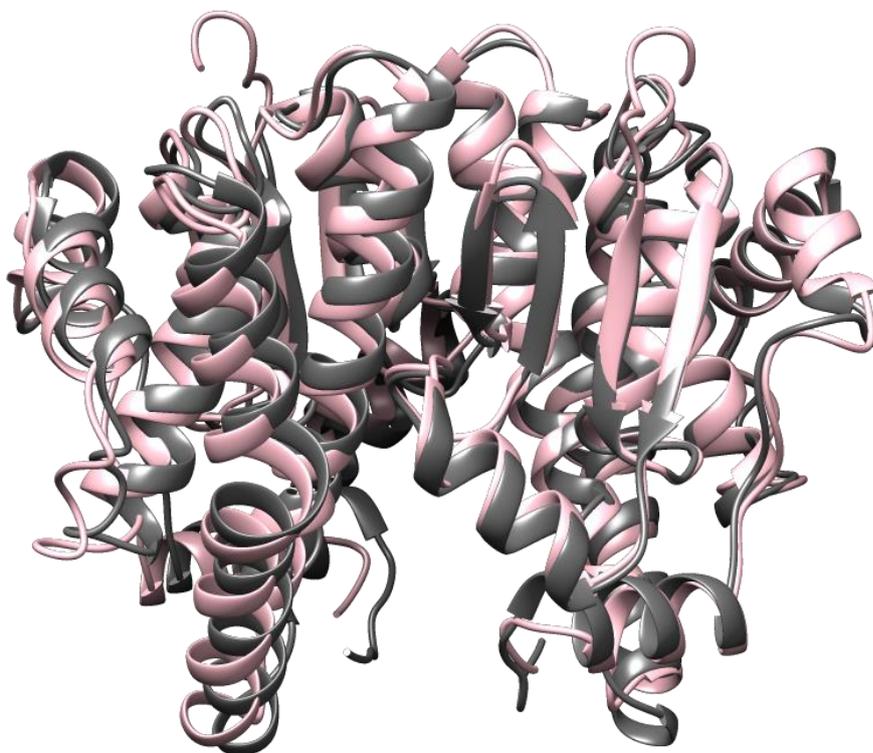


Em geral as GSTs adotam uma estrutura terciária bem conservada, apesar de pequenas diferenças de resíduos de aminoácidos entre as classes, e sua estrutura quaternária dimérica é essencial para um sítio ativo totalmente funcional (OAKLEY, 2011). Para a proteína de interesse CgGSTA1.2 os aminoácidos foram determinados como ativos e passivos para a construção do homodímero utilizando referências da literatura. As interações entre as subunidades das proteínas das classes pi, mi e alfa das GSTs acontecem de forma “*lock-and-key*”. Um resíduo chave do domínio I de uma subunidade que se insere em um resíduo do domínio II na outra subunidade (WONGSANTICHON; KETTERMAN, 2006). Os parâmetros utilizados na realização do *docking* proteína-proteína para GSTA de *C. gigas* foram baseados nas referências com proteínas de mamíferos (ARMSTRONG, 1997; AWASTHI, 2006; VARGO; NGUYEN; COLMAN, 2004; WALLACE; DIRR, 1999).

Para garantir a qualidade do modelo dimérico construído, além dos parâmetros fornecidos pelo próprio programa de *docking*, foram executadas análises qualitativas através do RMSD, que comumente é usado para avaliar similaridade entre estruturas (KUFAREVA; ABAGYAN, 2011; WU; WU, 2009).

Na sobreposição dos modelos diméricos apresentada na [Figura 10](#) é possível observar a GSTA de *C. gigas* (em rosa) e *G. gallus* (PDB 1VF1.1) (em cinza), realizada no UCSF Chimera, com valor de RMSD de 0,88 Å. Além de maior similaridade observada nos alinhamentos de sequência, o modelo construído também apresentou maior similaridade estrutural com a GSTA de *G. gallus*.

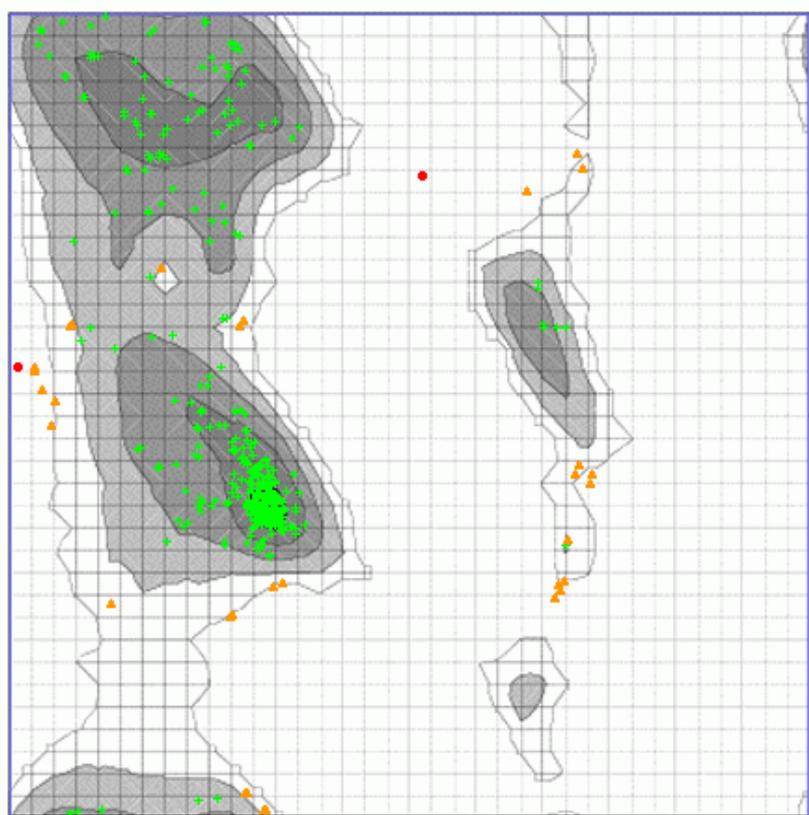
Figura 10. Sobreposição do modelo dimérico construído da proteína GSTA de *C. gigas* (em rosa) com modelo experimental da proteína retirado do PDB: 1VF1.1 de *G. gallus* (em cinza), realizado no UCSF Chimera.



Outro recurso de análise de qualidade utilizado foi o gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963) por meio do *Ramachandran Plot Server*. O gráfico de Ramachandran é uma ferramenta que avalia a

qualidade estereoquímica de um modelo de proteína. O gráfico é uma representação visual das tendências conformacionais da cadeia principal de um aminoácido. Essa metodologia avalia as distribuições dos ângulos de torção Φ e ψ em forma de gráfico e são comparadas a olho nu para determinar as semelhanças das preferências conformacionais da cadeia principal de resíduos de aminoácidos. As estruturas de aminoácidos na área de dados densos do gráfico de Ramachandran representam suas conformações mais comuns em estruturas de proteínas. Já as conformações em áreas mais espalhadas podem ser mais raras, mas ainda podem ser conformações genuínas, ou podem ser erros na determinação estrutural (ANDERSON *et al.*, 2005; SOBOLEV *et al.*, 2020).

Figura 11. Gráfico de Ramachandran do modelo de GSTA de *C. gigas*. Em verde são observados os ângulos torção considerados altamente favoráveis, em laranja ângulos favoráveis e em vermelho observações questionáveis, criado pelo Ramachandran Plot Server.



O gráfico de Ramachandran para CgGSTA1.2 obteve resultados de 368 aminoácidos (91,771%) em áreas altamente favoráveis, visíveis em verde na [Figura 11](#), 31 resíduos (7,731%) em áreas favoráveis observadas em laranja e apenas 2 aminoácidos (0,499%) foram

observações questionáveis, apresentadas em vermelho. Foi originalmente sugerido que mais de 90% dos pares Φ e ψ devem ser encontrados nas áreas favoráveis do gráfico, contudo foi redefinido posteriormente que 98% dos ângulos devem ser encontrados nessas regiões (ELSLIGER; WILSON, 2012; WLODAWER, 2017). Quando comparamos com a literatura sobre estruturas experimentais, os valores encontrados para o modelo dimérico construído pelo I-TASSER/HADDOCK, encontra-se dentro do esperado para considerar a estrutura construída dentro dos padrões de qualidade. Para o modelo computacional de CgGSTA1.2 quando somados os valores das regiões altamente favoráveis e favoráveis, observa-se mais de 99% de aminoácidos nessas áreas, sendo mais uma evidência da qualidade da estrutura gerada.

4.1.5 DOCKING MOLECULAR

Com o modelo 3D de CgGSTA1.2 finalizado, em sua forma dimérica, e sua qualidade verificada, foi possível prever as posições de atracamento molecular, ou *docking*, com a molécula de glutathiona reduzida (GSH) e com os substratos que serão testados na cinética enzimática. Para que seja possível entender os mecanismos celulares, é preciso compreender o modo de interação entre as moléculas, como a interação entre proteína-proteína, ou proteína e um ligante. O *docking* molecular é uma ferramenta que pode ser utilizada para prever essas interações e sugerir a energia livre (ΔG) e estabilidade dos complexos proteína-ligante (MORRIS; LIM-WILBY, 2008). O ΔG é a variação da energia livre em condições de temperatura e pressão constantes. Se o ΔG é negativo, então a reação é espontânea, ocorre sem entrada de energia externa (DEHOUCK et al., 2009; NELSON; COX, 2014). O principal objetivo da técnica é obter um complexo receptor-ligante com a menor energia livre. Dessa forma pode-se prever se a proteína tridimensional, que foi construída pelos programas de modelagem a partir da nova sequência identificada, tem potencial atividade de GST para ser classificada como tal (DAR; MIR, 2017; VERLI, 2014).

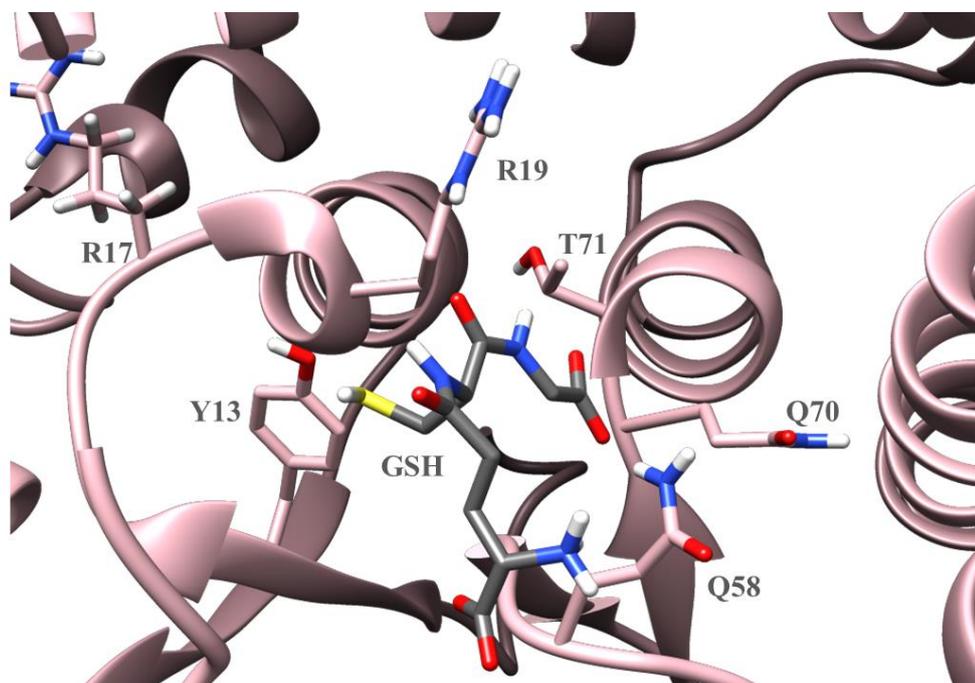
Diversos *softwares* podem processar o *docking* entre duas moléculas com o objetivo de entender e prever o reconhecimento molecular, encontrando modos de ligação prováveis, e prevendo a afinidade de ligação (MORRIS; LIM-WILBY, 2008). O SwissDock que foi empregado com essa finalidade, é um *software online* realizado por um grupo suíço que fornece acesso livre a estudantes, para realizar a predição das interações entre moléculas. O SwissDock

é baseado em um programa de *docking* proteína-ligante EADock DSS, com cálculos realizados no campo de força CHARMM (GROSDIDIER; ZOETE; MICHELIN, 2011). Com interface acessível, o usuário pode definir a região de interesse, delimitar uma caixa, onde o *docking* vai ocorrer com base em dados prévios sobre a enzima, porém na ausência dessa informação também é possível realizar o *blind docking*, quando o algoritmo procura por locais termodinamicamente favoráveis para interação do ligante sem uma região de interesse definida (BITENCOURT-FERREIRA; AZEVEDO, 2019; LOHNING *et al.*, 2017).

Os parâmetros de *docking* utilizados para CgGSTA foram a cadeia lateral flexível de 3Å em torno do ligante (o que aparece no *software* como um parâmetro ainda experimental) e modo *accurate*. A definição da região de interesse foi estipulada criando uma caixa de ligação (10 x 10 x 10 Å) no posicionamento do bolsão de ligação por meio da posição do resíduo de aminoácido envolvido na interação e estabilização do ligante, Y13. Os ligantes foram obtidos do PDB, por meio de uma busca de estruturas refinadas por maior identidade com a sequência de CgGSTA. Foi definido um *cutoff* de identidade de 40% e dessa forma foram escolhidos os ligantes GSH (PDB:1VF1) e CDNB (PDB: 1VF3) ambos de *G. gallus* para realizar os *dockings*. A interpretação dos resultados é facilitada pela visualização das poses de interação no programa UCSF Chimera.

O *docking* de CgGSTA1.2 com a glutationa reduzida - GSH ([12](#)) teve a melhor posição escolhida por parâmetros de comparação com uma estrutura cristalográfica depositada PDB (1VF1). Foi escolhida a posição que o ligante GSH se encontrava dentro do bolsão de ligação de forma semelhante à estrutura cristalográfica. O valor de ΔG obtido estima um valor de interação entre as moléculas de -7.17 kcal/mol para a pose determinada. Assim, o resultado da estimativa de ΔG sugere que a interação entre o receptor e o ligante é possível de acontecer. Foram avaliados também os aminoácidos potencialmente responsáveis pela estabilização do ligante no bolsão de ligação. A [12](#) apresenta os aminoácidos Y13, R17, R19, Q58, Q71 e T72 com suas cadeias laterais em destaque, esses são os resíduos descritos na literatura por serem responsáveis pela interação GSTA GSH.

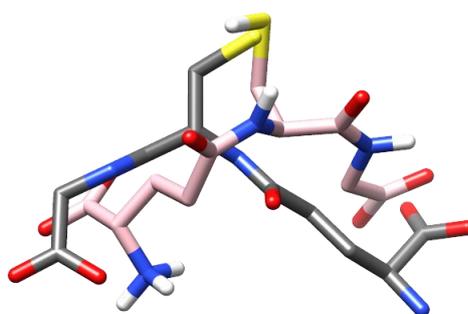
Figura 12. *Docking* de CgGSTA1.2 (em rosa) com a molécula de GSH (em cinza) com zoom no bolsão de ligação e os aminoácidos possivelmente envolvidos na estabilização desta ligação em destaque, Y13, R17, R19, Q58, Q70 e T71, realizado na SwissDock, imagem gerada pelo UCSF Chimera.



Como parâmetro adicional de comparação, foi executada a análise do valor do RMSD entre o ligante do *docking* realizado e da GSH presente na estrutura resolvida experimentalmente. Realizada no DockRMSD, o valor obtido foi de 6.6 Å, expondo um valor elevado de RMSD se considerarmos que o sucesso do *docking* baseia-se em um limite de até 2Å (MORRIS; LIM-WILBY, 2008). A avaliação da posição de encaixe ([Figura 13](#)) mostra o enxofre do resíduo de cisteína da GSH (em amarelo na [Figura 12](#)) das estruturas do modelo e do cristal em posições semelhantes. Este que foi o principal critério utilizado na escolha das poses devido a sua importância na ligação com a enzima e sua alta conservação entre as espécies (FROVA, 2006). O grupo SH da glutathiona é estabilizado por uma ligação com a tirosina do sítio ativo da GST, que guia o enxofre para a ligação com o segundo substrato (DOURADO; FERNANDES; RAMOS, 2010). Porém é possível avaliar que os resíduos de glutamato e glicina da GSH não se encontram tão próximos como o resíduo de cisteína e como o RMSD é um valor de média do desvio dos átomos, acredita-se que a isso se deve o seu alto valor. Desse modo entende-se que em um *docking* onde as cadeias laterais dos aminoácidos ficassem

flexíveis, esse valor poderia ser melhorado, atribuindo esses altos valores de RMSD também possivelmente a limitação da técnica de atracamento empregada.

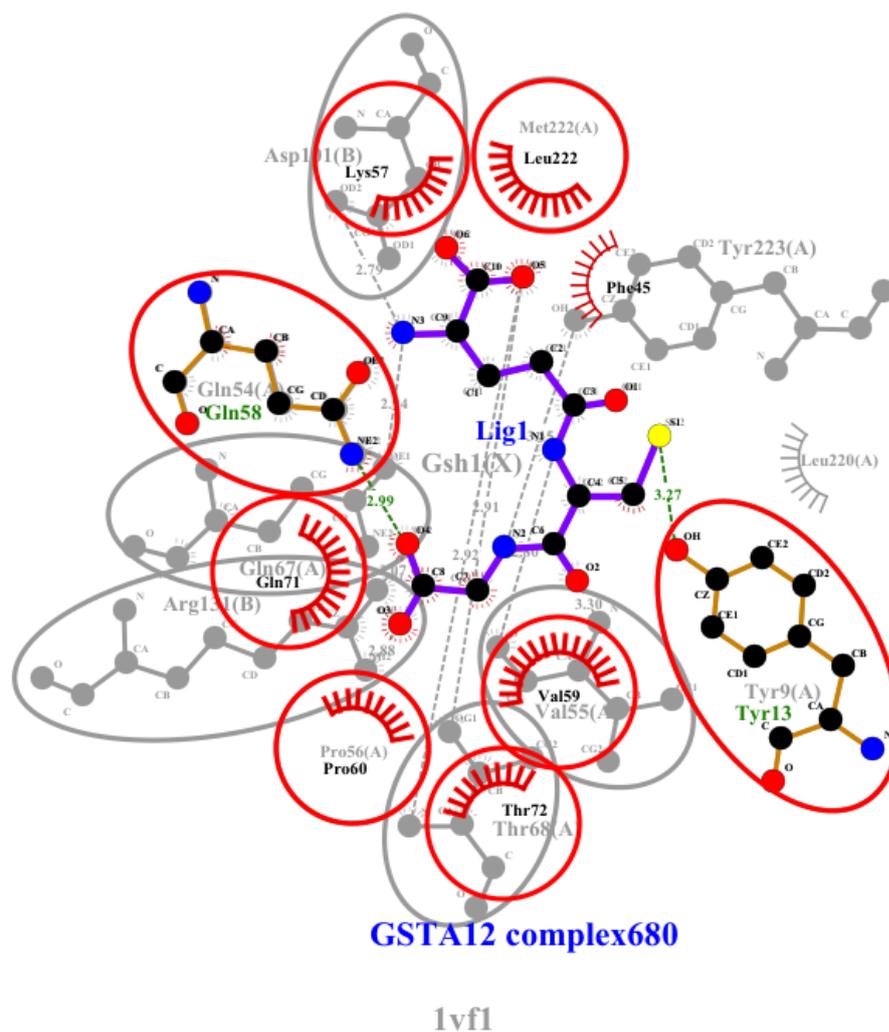
Figura 13. Sobreposição dos ligantes, em rosa GSH do *docking* realizado de *C. gigas* e em cinza, a GSH do modelo experimental PDB:1VF1, imagem gerada pelo software UCSF Chimera.



Na Figura 12 é possível observar interações da GSH com os resíduos de aminoácidos: Y13, R17, R19, Q58, Q70 e T71. Esses resíduos também foram visualizados em interações com o ligante quando avaliados de forma 2D, utilizando o *software* LigPlot (Figura 14).

O LigPlot gera um sistema gráfico em diagramas 2D das interações da proteína-ligante a partir das coordenadas 3D realizadas no *docking*. Nos diagramas são apresentadas interações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Nas interações de hidrogênio visualizadas na Figura 13 por traços na cor verde são mostrados os valores de distância das ligações onde o átomo de enxofre da enzima se liga a hidroxila da Y13 em uma distância de 3,27Å de acordo com os valores encontrados na literatura (SINNING *et al.*, 1993). No entanto, a interação com a R17 não aconteceu, como deveria ser o esperado para as GST da classe alfa. Acredita-se que este fato se deve à cadeia lateral do aminoácido estar voltada para o lado de fora do bolsão de ligação como é nitidamente observado na 12. Entende-se que talvez esse resultado não possa ser obtido com a metodologia de *docking* aplicada, pois esta não permite a total flexibilização das cadeias laterais de aminoácidos do bolsão de ligação.

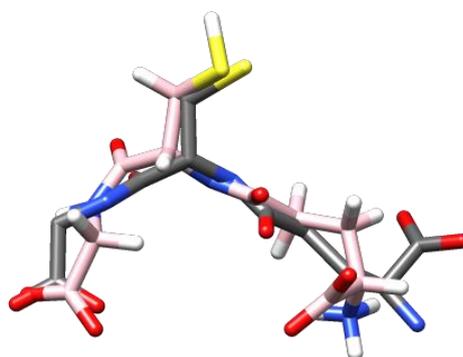
Figura 14. Docking da proteína CgGSTA1.2 com o ligante 1 (GSH) em formato 2D evidenciando a interação com os resíduos de aminoácidos Y13, Q58, Q70 e T71, em vermelho as interações hidrofóbicas com os aminoácidos F45, K57, V59, P60 e L222 sobreposto ao modelo cristal (PDB: 1VF1) ao fundo em cinza. Os círculos vermelhos mostram as compatibilidades entre os resíduos das duas estruturas realizada pelo *software* LigPlot.



Para melhor compreensão do resultado de *docking* com a molécula de GSH, foi realizada uma sobreposição das estruturas 2D do *docking* realizado para o modelo construído de CgGSTA com a imagem 2D do modelo cristalográfico de PDB: 1VF1 ([Figura 14](#)). Assim, é possível observar interação com os resíduos de aminoácidos Y13, Q58, Q70 e T71, em traços vermelhos são representadas as interações hidrofóbicas com os aminoácidos F45, K57, V59, P60 e L222. Os círculos vermelhos indicam que os resíduos de aminoácidos do modelo (aminoácidos coloridos) e do cristal (aminoácidos em cinza) coincidem.

Um último critério de comparação e validação do método de *docking* foi empregado e foram realizados *redockings* com as estruturas cristalográficas retiradas do PDB de referência. *Redocking* serve para avaliar se o método utilizado é capaz de reproduzir os dados experimentais do complexo proteína-ligante. Ele consiste em utilizar um modelo experimental retirado do PDB escolhido por uma busca refinada por alta identidade e refazer a ligação da proteína com o seu próprio ligante pelo mesmo método que está sendo utilizado para predição dos *dockings* dos modelos construídos para a GST da ostra *C. gigas* (VERLI, 2014).

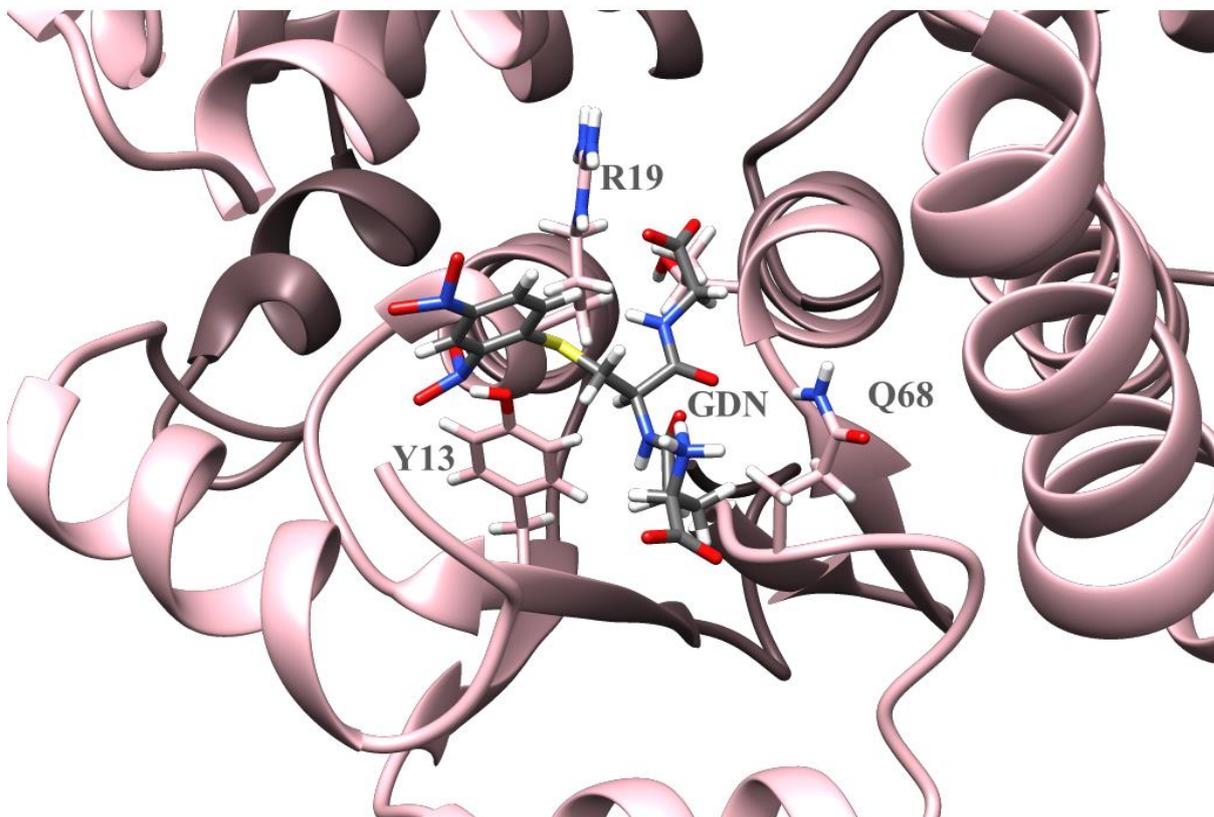
Figura 15. Sobreposição dos ligantes GSH do cristal PDB:IVF1 depositado no PDB (em cinza) e do *redocking* executado no SwissDock (em rosa) imagem gerada através do *software* UCSF Chimera.



O *redocking* do modelo de estrutura cristalográfica de raio-x (PDB 1VF1) realizado no SwissDock obteve valores de ΔG -10.63 kcal/mol. Quando comparado ao valor de ΔG do *docking* -7,17 kcal/mol é possível ver que ambos os valores são negativos e podem indicar que a ligação ocorre de forma favorável. O valor de RMSD do *redocking* para a GSH foi de 2.148 Å executado no DockRMSD indicando a alta proximidade entre os ligantes, dessa forma validando a técnica escolhida e os resultados sugeridos. Na [Figura 15](#) os ligantes do PDB (cinza) e do *redocking* (rosa) foram sobrepostos no *software* UCSF Chimera a fim de facilitar uma comparação visual entre as diferenças espaciais das moléculas.

Depois de finalizado o atracamento com a molécula de GSH no sítio ativo em uma pose dentro dos padrões conhecidos para GSTs de outros animais e a sua qualidade garantida, foi realizada então a predição do *docking* com substratos conhecidos da literatura para as GSTs da classe alfa já estudadas.

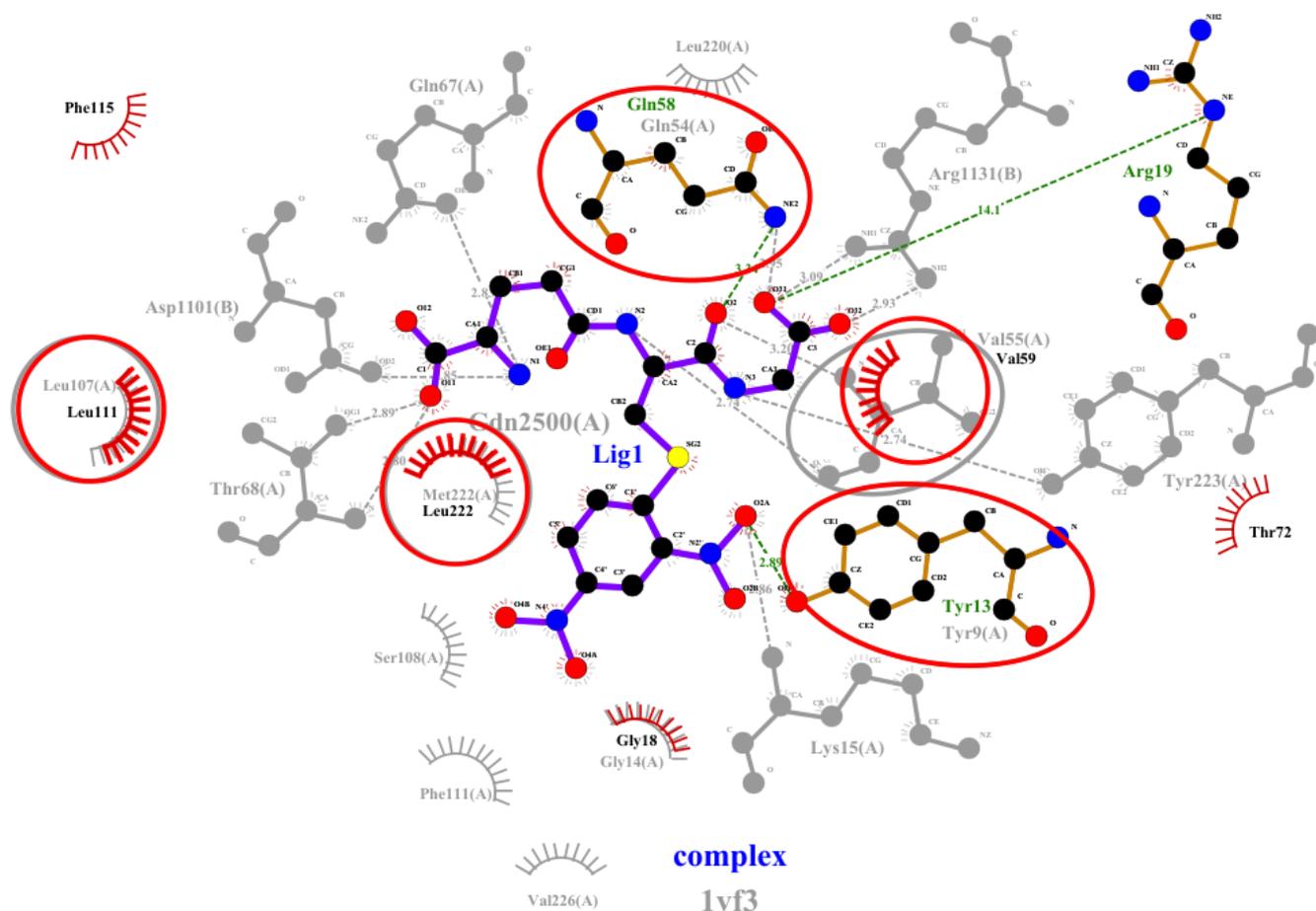
Figura 16. Docking realizado no SwissDock entre a proteína CgGSTA1.2 com o ligante GDN (em cinza) em evidência as cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos na interação: Y13, R19 e Q68, imagem realizada no UCSF Chimera.



O CDNB é um substrato descrito com atividade de indução da atividade das GSTs. Considerado um substrato universal por medir a atividade global das GSTs (MANNERVIK; JEMTH, 2002; TRISCIANI et al., 2012). Foi, portanto, utilizado nos estudos *in silico* com o modelo construído. A estrutura tridimensional da molécula do CDNB foi obtida do PDB (PDB:1VF3) já sendo apresentado em sua forma conjugada com a GSH que forma o composto GDN, e aqui foi testado pela mesma metodologia empregada para as avaliações com o ligante GSH.

Na [Figura 16](#) está apresentada a imagem do *docking* da proteína de *C. gigas* com a molécula de GDN que obteve um resultado de -8.56 kcal/mol de ΔG . Estão evidenciados os resíduos de aminoácidos Y13, R19, Q68 que são os responsáveis pela estabilização do ligante GDN no sítio de ligação da enzima. Esses mesmos resíduos podem ser observados na visualização do *docking* em forma 2D gerada no *software* LigPlot ([Figura 17](#)) em sobreposição a estrutura cristalográfica retirada do PDB: 1VF3.

Figura 17. *Docking* da proteína CgGSTA1.2 com GDN em sua forma 2D (colorido) sobreposta com o cristal 1VF3 (em cinza). Interações entre resíduos de aminoácidos em evidência Y13, R19 e Q58 e interações hidrofóbicas em vermelho para os resíduos G18, V59, T72, L111, F115 e L222, os círculos representam sobreposições entre os resíduos das duas estruturas. Imagem realizada no LigPlot.

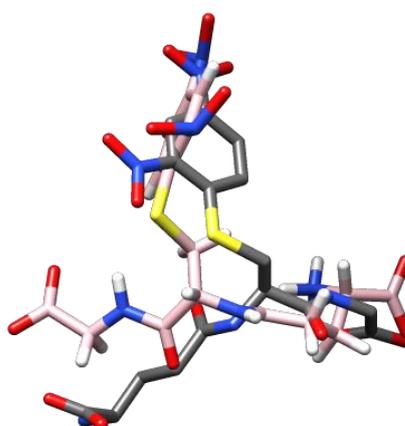


Na [Figura 17](#) são apresentadas as interações entre resíduos de aminoácidos em evidência: Y13, R19 e Q58 e interações hidrofóbicas em vermelho para os resíduos: G18, V59, T72, L111, F115 e L222. O resultado obtido no *docking* se assemelha ao modelo cristalográfico e fica evidenciado, por exemplo, no aminoácido Y13 (modelo construído em colorido) e Y9 (cristal em cinza), que estão sobrepostos exatamente no mesmo lugar e com uma ligação de hidrogênio com 2,89Å. Sendo este um aminoácido conhecido por estar envolvido na estabilização da GSH e que fornece orientação ao substrato eletrofílico (aqui já conjugados) para se ligar no bolsão de ligação (THORSON *et al.*, 1998).

Quando comparamos o ligante obtido do *docking* e o do cristal em uma análise gerada pelo DockRMSD, obtivemos um RMSD de 6.0 Å. A [Figura 18](#) traz a sobreposição entre as estruturas do atracamento (rosa) e do cristal (cinza) e é possível avaliar que os ligantes mantêm

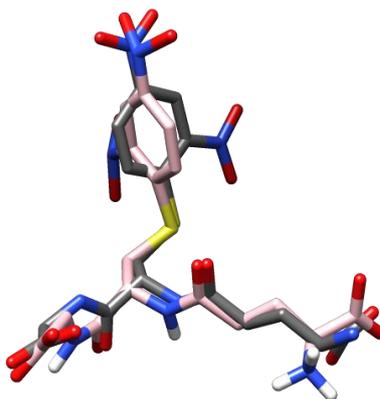
semelhanças em relação às suas posições, porém com diferenças espaciais, que são atribuídas ao elevado valor de RMSD.

Figura 18. Sobreposição dos ligantes GDN do *docking* de CgGSTA1.2 (em rosa) e do cristal PDB:1VF3 (em cinza), imagem realizada no UCSF Chimera.



O *redocking* do modelo cristalográfico 1VF3 de *G. gallus* depositado no PDB foi utilizado para validar a técnica de *docking* como uma forma de controle da análise. O ligante GDN foi retirado da estrutura do cristal e recolocado através do método de *docking* por meio do SwissDock. O resultado alcançado teve em sua melhor pose um ΔG -11.78 kcal/mol e um RMSD de 1.6 Å obtido no DockRMSD. A [Figura 19](#) mostra a sobreposição das estruturas para oferecer uma melhor visualização do resultado do DockRMSD, em rosa o *redocking* e em cinza o cristal, gerada no UCSF Chimera.

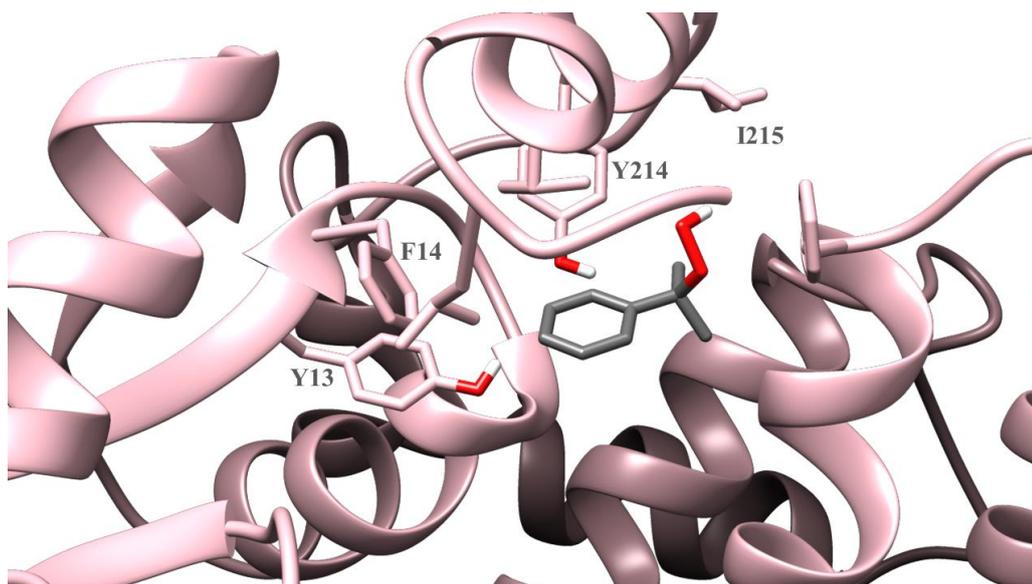
Figura 19. Sobreposição dos ligantes GDN do *redocking* (em rosa) e do cristal PDB: 1VF3 (em cinza) imagem realizada no UCSF Chimera.



Outro potencial substrato para GSTs já descrito com atividade em outros animais estudados, foi testado *in silico* a fim de conhecermos a potencialidade de sua interação com a isoforma estudada. As GSTs da classe alfa têm atividade de glutathione peroxidase proporcionando proteção contra o estresse oxidativo de produtos como o hidroperóxido de cumeno (CHP) regulando suas concentrações, atribuindo assim às GSTs dessa classe um caráter de defesa antioxidante (AWASTHI *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 1999).

O *docking* GSTA CHP foi realizado também pelo SwissDock determinando o espaço do bolsão de ligação, para deste modo limitar o número de tentativas de poses de encaixe. Como não foi possível encontrar nenhum modelo cristalográfico de CHP no banco de dados PDB para aplicar como referência, o modelo 3D do ligante foi retirado do PubChem, banco de dados público de substâncias químicas.

Figura 20. *Docking* entre CgGSTA1.2 e o ligante hidroperóxido de cumeno (em cinza). Em evidência as cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos na interação: Y13, F14, Y214 e I215. Imagem obtida no UCSF Chimera.



O resultado do *docking* foi definido por meio do menor valor de ΔG -6.11 kcal/mol. A [Figura 20](#) traz a interação receptor-ligante evidenciando os aminoácidos mais próximos ao CHP, Y13, F14, Y214 e I215, que possivelmente são os resíduos responsáveis pela interação entre o ligante e a proteína. Devido à falta de uma estrutura 3D para assumir como referência,

não foi possível calcular os valores de qualidade do *docking* como RMSD e *redocking*. Contudo, por meio dessa análise foi possível inferir que a interação entre enzima substrato é plausível, devido a seus valores negativos de ΔG , o que corrobora os resultados *in vitro* onde foi identificada a atividade de glutathione peroxidase para a rGSTA de *C. gigas*.

4.2 IN VITRO

4.2.1 TRANSFORMAÇÃO E EXPRESSÃO

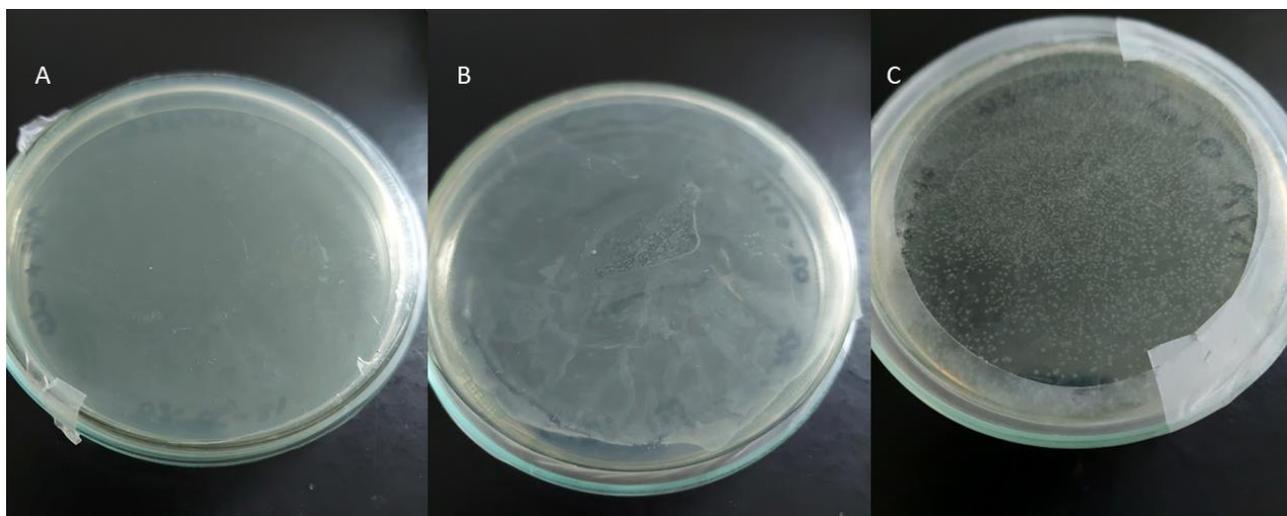
O processo de transformação envolve a absorção de DNA extracelular através da membrana para dentro da célula (PANJA *et al.*, 2008). O método executado para a transformação de *E. coli* BL21 com o gene de *C. gigas* foi o choque térmico (CALVETE; CASEIRO; SOUZA, 2015; FROGER; HALL, 2007). A eficiência da transformação foi examinada por meio da observação dos meios de cultura realizados com a bactéria transformada e com controles negativos utilizando a bactéria sem transformação.

Para nos certificarmos de que não havia contaminações na sala de microbiologia e no material utilizado, a cada avaliação de crescimento bacteriano foram realizados controles para garantia de que apenas as bactérias *E. coli* estavam sendo cultivadas. Na [Figura 21A](#) está apresentado o meio de cultura (LB) ágar contendo os antibióticos cloranfenicol e ampicilina. Com o intuito de realizar um controle negativo uma alíquota das bactérias competentes foi inoculada na placa, com 0,5 µl de água, ao invés de plasmídeo. Como esperado, não foi observado crescimento bacteriano contaminante.

Como forma de controle do desempenho dos antibióticos, a cepa de BL21 competente transformada foi inoculada em placa de meio de cultura LB ágar sem antibióticos. Foi evidente o crescimento bacteriano forrando a placa ([Figura 21B](#)). Esse resultado indicou a potência dos antibióticos, uma vez que na ausência deles todas as bactérias, com ou sem plasmídeo, conseguiram crescer forrando a placa. A cepa de BL21 transformada com o gene de interesse foi inoculada em placa com LB ágar com os antibióticos cloranfenicol e ampicilina ([Figura 21C](#)) formando colônias isoladas, como o esperado.

Foi observada a presença de UFC (unidades formadoras de colônia) demonstrando o sucesso da técnica (PANJA *et al.*, 2008). Devido à presença do antibiótico ampicilina no meio de cultura foi possível garantir que o DNA plasmidial de interesse foi incorporado pelas bactérias, pois este foi construído possuindo resistência ao antibiótico que está presente no meio de cultivo e as bactérias cresceram nestas condições. As colônias contendo o gene *CgGSTA1.2* foram utilizadas para a expressão da proteína alvo e o sedimento bacteriano foi utilizado para a purificação da proteína.

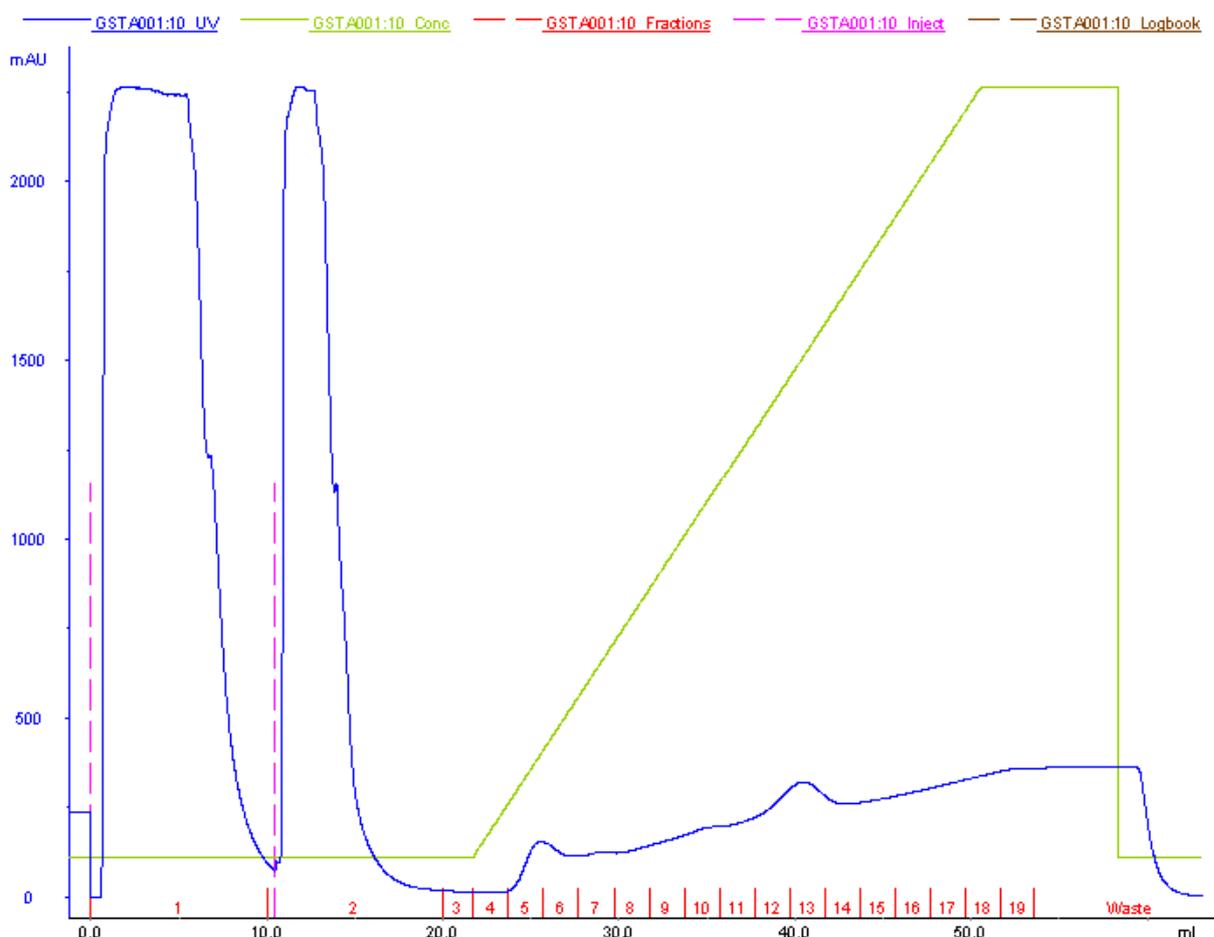
Figura 21. A) Meio de cultura LB ágar contendo antibiótico cloranfenicol e ampicilina sem BL21, controle negativo. B) Placa contendo meio de cultura LB ágar, sem antibióticos, com crescimento da bactéria BL21 transformada. C) Placa contendo meio de cultura LB ágar com antibióticos cloranfenicol e ampicilina, com crescimento de BL21 transformada com DNA plasmidial.



4.2.2 PURIFICAÇÃO

A cromatografia é um dos métodos mais comuns para a purificação de proteínas. A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) separa as proteínas pela sua capacidade de se ligar a um grupo químico por afinidade (cromatografia de afinidade) (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). Como a aplicação da técnica de DNA recombinante na construção do plasmídeo foi incorporada uma cauda na proteína de dez histidinas na porção N-terminal (LOUGHRAN; BREE; WALLS, 2016). Logo foi possível realizar a purificação da proteína por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel (GE Healthcare HisTrap HP) em ÄKTA purifier (BORNHORST; FALKE, 2000). A cauda possui um tamanho pequeno (~2 kDa) e raramente interfere na estrutura e função da proteína e por este motivo não foi retirada (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). A proteína de interesse foi eluída da coluna de níquel por competição com imidazol. Onde o tampão B foi adicionado de forma crescente até a proteína ser eluída da coluna, o que aconteceu com aproximadamente 350 mM de imidazol no sistema de purificação ([Figura 22](#)).

Figura 22. Cromatograma da purificação da proteína rGSTA1.2 em FPLC - ÄKTA. Em azul está apresentada a leitura UV das proteínas, as injeções da amostra em rosa, a concentração do tampão B contendo imidazol em verde e as frações coletadas das amostras em vermelho. Os picos de eluição da proteína se encontram nas frações 12 a 14.

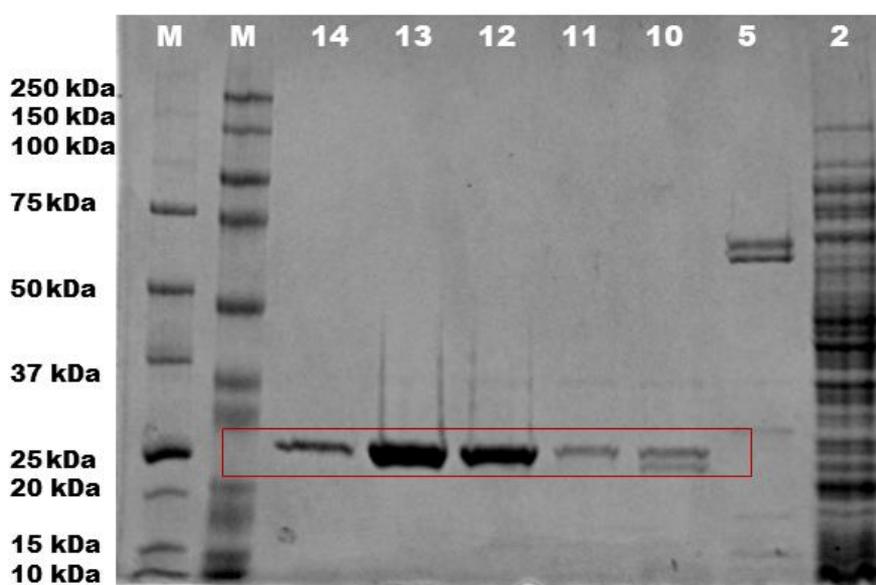


O cromatograma mostra os picos de leitura de luz UV (280 nm) evidenciados quando uma proteína passa pelo leitor. Em verde é possível avaliar a concentração do tampão B que contém imidazol. O processo foi realizado com duas injeções de 5ml de amostra contando com um pico de eluição da amostra nas frações coletadas de número 12 a 14. O pico que se refere a fração 13 foi utilizado para a diálise e teve suas proteínas totais quantificadas pelo método de Bradford e obteve um valor de 0,372 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína.

As frações coletadas durante a purificação foram avaliadas por SDS-PAGE (Figura 23). No gel constam os marcadores moleculares *unstained* e *rainbow*, as frações iniciais da purificação (fração 2 e 5) que são provavelmente formadas de proteínas inespecíficas que

passam direto pela coluna e têm diversos tamanhos. Com o aumento da concentração de imidazol, ao longo da purificação, a proteína foi eluída da coluna de níquel e é possível observar no gel de eletroforese a proteína recombinante pura CgGSTA1.2 começando a aparecer nas frações 10 até a 14 aparecendo em uma banda específica com aproximadamente 28 kDa como se espera para a proteína mais a cauda de histidinas.

Figura 23. SDS-PAGE das frações de purificação da proteína rGSTA1.2. Da esquerda para a direita marcador molecular *unstained*; marcador molecular *rainbow*; fração 14; fração 13; fração 12; fração 11; fração 10; fração 5 e fração 2, gel corado com azul de *coomassie*, em destaque vermelho rGSTA purificada.



4.2.3 DIÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

Após a purificação da proteína recombinante, foi realizada a diálise para a retirada do imidazol, pois este composto pode interferir nos testes cinéticos. A diálise seguiu através da troca de tampão por difusão seletiva utilizando uma membrana semipermeável. São utilizadas membranas específicas com poros de tamanhos definidos que permitem a passagem seletiva dos tampões atingindo equilíbrio de concentração sem perder a proteína (ANDREW; TITUS; ZUMSTEIN, 2001; PESARRODONA; UNZUETA; VÁZQUEZ, 2014).

A amostra utilizada foi a de maior concentração e pureza, (fração 13) verificada pelo gel de eletroforese. A diálise foi realizada por meio do kit PlusOne Mini Dialysis (GE

Healthcare). A primeira tentativa de diálise foi realizada com o mesmo tampão A da purificação, contudo utilizando esse protocolo a proteína acabou precipitando no tubo. Na segunda tentativa foi utilizado o tampão A com modificações na concentração de NaCl de 250 mM para 350 mM, para que se aproximasse à concentração de imidazol da proteína recombinante. Utilizando esse protocolo foi possível realizar a troca de tampão retirando o imidazol sem perder a proteína. Após a diálise a proteína foi quantificada sem diluições e a concentração resultante foi de 0,372 µg/µl de proteína. O branco foi realizado com o tampão da segunda troca da diálise.

4.2.4 CINÉTICA

Testes com substratos conhecidos de GST foram utilizados em ensaios para caracterizar funcionalmente a enzima. Um evento característico no mecanismo das GSTs é a desprotonação do grupo tiol da GSH e formação do ânion GS^- , que então reage com o substrato eletrofílico aromático (GILDENHUYS *et al.*, 2010). Os compostos eletrofílicos podem entrar no organismo de forma exógena, ou serem produzidos endogenamente. Pesticidas, prostaglandinas, agentes cancerígenos e quimioterápicos são alguns dos substratos potenciais para reações de conjugação de glutatona tornando-os mais solúveis e de fácil excreção (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

O primeiro ensaio espectrofotométrico que mede a atividade de GST foi desenvolvido por Habig *et al.* (1974), usando CDNB como substrato. O produto da conjugação entre GSH + CDNB apresenta absorção de luz no comprimento de onda de 340 nm (ROBIN; ANSARI; UPPUGUNDURI, 2020). O CDNB é o substrato mais comumente utilizados, denominado como generalista, pois tem atividade com diversas classes de GSTs, por esse motivo o ensaio é usualmente chamado de quantificação de GST total (MANNERVIK; JEMTH, 2002). Assim, a fim de confirmar a funcionalidade da enzima sintetizada e comprovar sua classificação como uma GST, sua atividade cinética foi avaliada. O primeiro substrato testado foi o CDNB. Foram elaborados testes com diferentes concentrações de amostra, aplicando 1 µl, 2,5 µl e 5 µl de proteína recombinante, pura e dialisada junto ao substrato CDNB 1 mM e GSH 1 mM (Tabela 5) e foram obtidos valores de 633,02, 641,37 e 654,53 µmol/min/mg de proteína respectivamente.

Tabela 5. Valores de atividade de glutathiona transferase com substrato CDNB em diferentes concentrações de proteína recombinante, resultados em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

1 μl	2,5 μl	5 μl
633,02	641,37	654,53

Para que os valores obtidos possam ser mais bem compreendidos e que possamos traçar um paralelo, foi realizada a [Tabela 6](#) com os valores de atividade retirados da literatura para GSTs da classe alfa de diferentes organismos com o substrato CDNB, também testados por meio de expressão heteróloga da proteína. Observa-se que os valores encontrados pelos experimentos realizados não se parecem entre os organismos apresentados, pois são bastante distintos entre si, contudo é possível assim obter um *range* de valores disponíveis já publicados que vão de 380 para *Pleuronectes platessa* a 1,67 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para *Meleagris Gallopavo*.

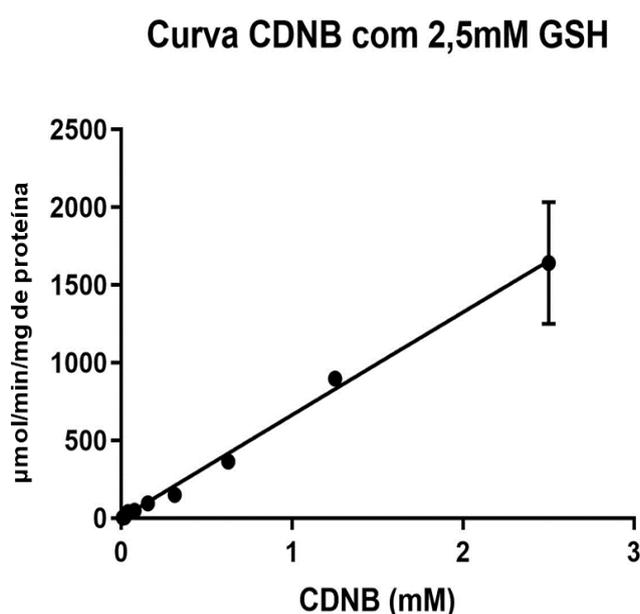
Tabela 6. Valores de atividade de GST com substrato CDNB em diferentes organismos, dados retirados da literatura, resultados em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

organismo	isoforma	atividade CDNB	referência
<i>Pleuronectes platessa</i>	GSTA1	380 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	MARTINEZ-LARA; LEAVER; GEORGE, 2002
porco	GSTA1-1	135 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	FEDULOVA; RAFFALLI-MATHIEU; MANNERVIK, 2011
<i>Pagrus major</i>	GSTA1	9,64 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	KONISHI <i>et al.</i> , 2005
cavalo	GSTA3-3	5.20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	LINDSTRÖM <i>et al.</i> , 2018
<i>Meleagris Gallopavo</i>	GSTA1-1	1,67 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	KIM <i>et al.</i> , 2011

Como análise adicional, além da atividade, foi realizada uma curva de saturação para determinar o k_m e V_{max} relativos ao CDNB (JOHNSON, 2013). O substrato foi utilizado no ensaio em concentrações crescentes de 0,0014 - 2,5 mM, juntamente com uma concentração final fixa de GSH (5 mM e 2,5 mM) a 5% de etanol e 2,7 μl de proteína (1 μg) rGSTA. O primeiro teste ([Figura 24](#)) foi realizado seguindo parâmetros internos do laboratório LABCAI

utilizando 2,5 mM final de GSH no ensaio. Contudo, por meio desse protocolo não foi possível atingir a saturação da enzima que na concentração máxima do substrato ainda se encontra na fase exponencial no gráfico. Quando os resultados foram analisados no GraphPad Prism os dados de Michaelis-Menten foram reportados como ambíguos apresentando valores de $k_m \sim 383$ e V_{max} de ~ 255489 . Quando a concentração do substrato aumenta, a reação da enzima também aumenta, até que todos os seus sítios ativos estejam ocupados, ou seja, quando toda a enzima presente estiver complexada com o substrato - ES. Nesse caso a adição de mais substrato não muda a taxa da reação, quando ela atinge o seu platô. Essa região de V_0 tipo platô está próxima à velocidade máxima, V_{max} , e o k_m é a constante de Michaelis-Menten, reflete metade do valor de V_{max} (BISSWANGER, 2014; JOHNSON; GOODY, 2011; NELSON; COX, 2014). Em condições saturantes a velocidade da reação é proporcional à quantidade de proteína, mas para isso acontecer é necessária uma concentração de substrato muitas vezes maior que a concentração da proteína, de acordo com o valor de k_m para cada enzima (WILKINSON, 1971).

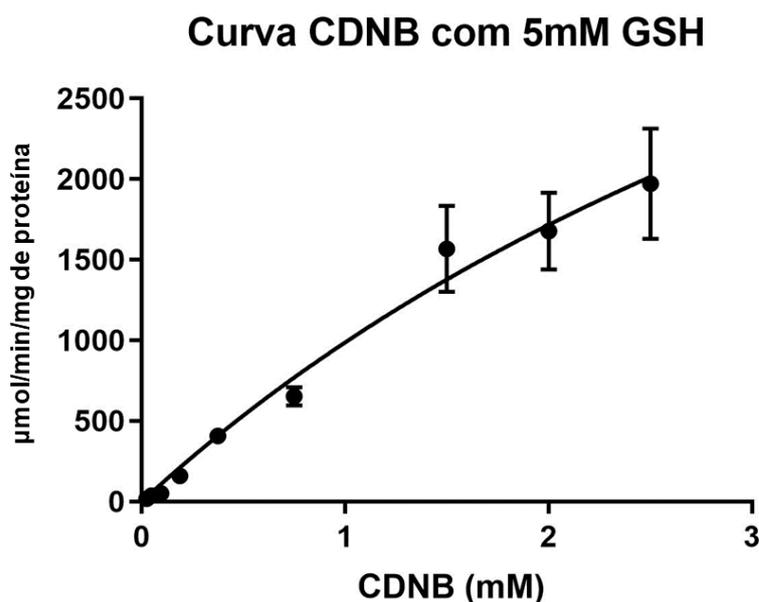
Figura 24. Curva de saturação do substrato CDNB em concentração crescente de 0,0014 - 2,5mM com GSH em concentração fixa de 2,5 mM.



Então foi executada uma segunda tentativa com os parâmetros do ensaio baseados em estudos prévios de GSTs alfa de animais vertebrados encontrados na literatura (FEDULOVA;

RAFFALLI-MATHIEU; MANNERVIK, 2011; LINDSTRÖM *et al.*, 2018) utilizando 5 mM final de GSH nas mesmas concentrações crescentes de CDNB. Nessas condições de ensaio foi possível obter resultados cinéticos em valores de k_m (5,627 mM) e V_{max} (6547 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) com auxílio do *software* GraphPad Prism 9 (Figura 25).

Figura 25. Curva de saturação do substrato CDNB com concentração crescente de 0,0014 - 2,5 mM e concentração fixa de GSH 5 mM.



Porém, se considerarmos que a concentração de substrato nos experimentos deve ser de 5-10 vezes o valor do k_m (BISSWANGER, 2014; WILKINSON, 1971) então seria necessária uma concentração entre 25 - 50 mM de CDNB, segundo o valor de k_m alcançado, para atingir a fase estacionária com a enzima recombinante de ostra, o que acabaria sendo impraticável *in vitro*. Para melhor compreensão dessa análise seriam necessários estudos de padronização com a avaliação de cada um dos parâmetros da reação, concentrações dos reagentes, temperatura e pH, por exemplo.

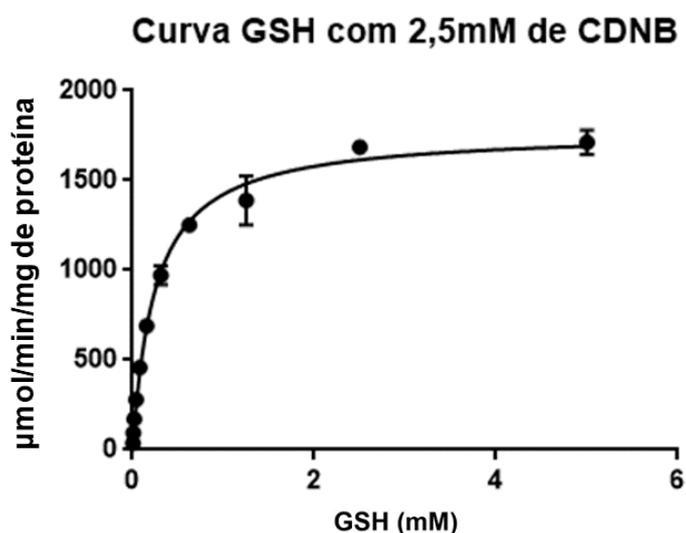
A fim de observar dados já apresentados em publicações foi construída a Tabela 7 que demonstra os valores de k_m para diferentes organismos utilizando o substrato CDNB em concentração crescente e a GSH em concentração fixa, onde são visualizados valores de 6,8 a mM a 200 μmol de variação de k_m em diferentes animais.

Tabela 7. Valores de k_m com substrato CDNB para diferentes organismos.

organismos	isoforma	atividade	referência
<i>Pleuronectes platessa</i>	GSTA1-1	$K_m = 6,8 \text{ mM}$	MARTINEZ-LARA; LEAVER; GEORGE, 2002
<i>Pagrus major</i>	GSTA1	$K_m = 1,33 \text{ mM}$	KONISHI <i>et al.</i> , 2005
cavalo	GSSTA3-3	$K_m = 1490 \text{ } \mu\text{mol}$	LINDSTRÖM <i>et al.</i> , 2018
porco	GSTA1-1	$K_m = 200 \text{ } \mu\text{mol}$	FEDULOVA; RAFFALLI-MATHIEU; MANNERVIK, 2011

Para determinar o k_m e V_{max} relativos à GSH foi realizada uma curva de saturação com concentrações crescentes de GSH (0,0048 - 5 mM) na presença de uma concentração fixa de CDNB (2,5 mM) com 1 μg de proteína recombinante (2,7 μl). Os valores obtidos foram de k_m : 0,2464 mM e de V_{max} : 1774 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Sendo o valor de k_m obtido se aproximando dos valores encontrados na literatura para GSTA1-1 de *Pleuronectes platessa* com um k_m igual a 0,6 mM e para *Pagrus major* um valor de $k_m = 0,40 \text{ mM}$ (KONISHI *et al.*, 2005; MARTINEZ-LARA; LEAVER; GEORGE, 2002).

Figura 26. Curva de saturação de GSH com concentração crescente de 0,0048 a 5 mM e CDNB 2,5 mM.



Os resultados foram obtidos por regressão não-linear ajustados ao modelo de Michaelis-Menten. Neste modelo a concentração de substrato nos ensaios deve ser de 5-10 vezes o valor do k_m (BISSWANGER, 2014; WILKINSON, 1971), logo a concentração de substrato 10 vezes maior ao k_m é o próprio valor utilizado para a curva de saturação (2,5 mM), que satisfaz os parâmetros para executar a hipérbole observada na [Figura 26](#).

Além da relevância do CDNB, substrato bastante utilizado para a determinar a atividade de glutathione transferase, a classe alfa possui outros tipos de atividades conhecidas. Uma delas é a de glutathione peroxidase, o que propõe que essas enzimas possuam a capacidade de atuar na proteção contra a peroxidação lipídica (MANNERVIK; JEMTH, 2002; YANG *et al.*, 2001).

A rGSTA sintetizada funcionou como uma glutathione peroxidase independente de selênio com uma atividade com hidroperóxido de cumeno, onde o consumo do NADPH foi monitorado espectrofotometricamente a 340 nm. Essa atividade se dá por meio da degradação do hidroperóxido com a doação de elétrons da GSH. Porém para manter a GSH reduzida durante o processo de catálise, a glutathione reductase (GR) catalisa a oxidação do NADPH a NADP⁺ pela transformação de glutathione dissulfídica (GSSG) em sua forma reduzida (GSH) (AWASHI, 2006; PETTERSSON; JOHANSSON; MANNERVIK, 2002; YANG *et al.*, 2001).

O primeiro teste de atividade foi feito com a concentração de 1,5 mM de CHP onde foi observada diferença de atividade da proteína em relação ao branco. Para evidenciar os resultados, um segundo teste foi realizado na concentração de 3 mM de CHP onde também se observou diferença de absorvância em relação ao branco da amostra. Os valores da cinética enzimática estão apresentados na [Tabela 8](#) que para 1,5 mM de substrato a atividade foi de 113,37 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e com 3 mM de CHP a atividade foi de 163,90 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

Tabela 8. Valores cinéticos para atividade de glutathione peroxidase com substrato CHP, resultados em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

1,5 mM CHP	3 mM CHP
113,37	163,90

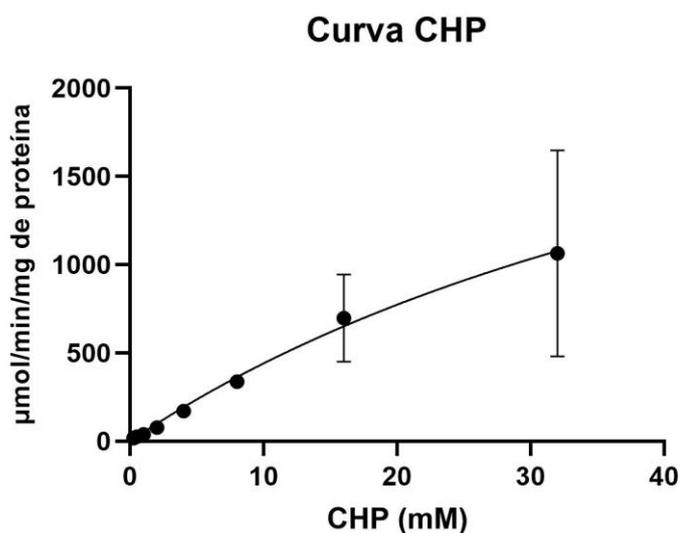
Os valores obtidos de atividade com o substrato CHP de *C. gigas* foram comparados a dados da literatura e a [Tabela 9](#) traz a atividade cinética de publicações a fim de traçar um *range*

para diferentes organismos, pelo mesmo método de expressão heteróloga. Onde *Pleuronectes platessa* apresentou um valor de atividade de 25,8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e já em perus *Meleagris Gallopavo* esse valor foi de 0,45 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

Tabela 9. Atividade literatura para o substrato CHP.

organismos	isoforma	atividade	referência
<i>Pleuronectes platessa</i>	GSTA1	25,8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	MARTINEZ-LARA; LEAVER; GEORGE, 2002
Porco	GSTA1-1	3,9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	FEDULOVA; RAFFALLI-MATHIEU; MANNERVIK, 2011
Cavalo	GSTA3-3	1,85 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	LINDSTRÖM et al., 2018
<i>Meleagris Gallopavo</i>	GSTA1-1	0,45 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	KIM et al., 2011

Figura 27. Curva de saturação de CHP com concentração crescente de 0,25 a 32 mM.



Além da atividade de glutathiona peroxidase com o substrato hidroperóxido de cumeno, foi possível estimar valores de k_m e V_{max} por meio de uma curva de saturação (Figura 27). Foram utilizadas concentrações crescentes de CHP (0,25 - 32 mM) em concentrações fixas das demais substâncias da reação. Os resultados obtidos dessa análise foram de uma V_{max} de 3138 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e um k_m de 61,15 mM. Não se aproximando ao valor encontrado de $k_m = 39 \mu\text{M}$ para GSTA1 analisada em porcos (FEDULOVA; RAFFALLI-MATHIEU; MANNERVIK, 2011).

Se considerarmos as condições descritas por Wilkinson, (1971) que ao elaborar um ensaio enzimático é conveniente utilizar concentrações de substrato cerca de 5 a 10 vezes o k_m , então seria necessária uma concentração de pelo menos 300 mM de CHP para ocorrer saturação. É possível que a enzima possua uma baixa afinidade por esse substrato e a isso se confere esse valor alto de substrato necessário para ocorrer a aproximação da V_{max} . Ainda, para que fosse possível descobrir mais detalhes sobre cada substrato testado, sua atividade e valores de k_m e V_{max} em diferentes condições, seria necessário um estudo de padronização onde cada substância do ensaio tivesse suas concentrações testadas e avaliadas. Além disso, para que fosse possível desvendar um substrato que tenha alta especificidade pela enzima recombinante produzida, seriam necessários mais testes *in vitro* com diferentes tipos de substratos já descritos na literatura.

5. CONCLUSÕES

Esse estudo mostrou que a sequência de GST alfa de *C. gigas* identificada em análises anteriores do LABCAI, quando alinhada às de outras espécies apresentou uma maior conservação na região N-terminal do que na região C-terminal, como descrito em GSTs de animais vertebrados. Além disso, apresenta os aminoácidos conhecidos da região $\beta\beta\alpha$ envolvidos na interação com a GSH conservados em quase todas as espécies avaliadas.

O modelo tridimensional para CgGSTA foi construído utilizando o *software online* I-TASSER, onde foi obtida uma estrutura com topologia e qualidade avaliada por diferentes metodologias garantindo sua precisão, com poucos desvios quando comparadas com estruturas experimentais depositadas em bancos de dados públicos. A forma dimérica do modelo foi construída foi considerada apropriada.

O *docking* molecular foi processado no programa *online* SwissDock com os ligantes GSH, CDNB e CHP. O *docking* com a glutationa reduzida dispôs de resultados com o ligante dentro do bolsão de ligação de acordo com o esperado e encontrado em estruturas experimentais. As interações proteína/ligante foram avaliadas em apresentação 2D pelo *software* LigPlot, onde foram observadas interações com os resíduos de aminoácidos esperados, descritos na literatura.

Para a posição de atracamento com o ligante GSH foi obtido um valor de ΔG de -7 kcal/mol que indica que a interação é provável de acontecer e não se afasta do valor para o *redocking* utilizando o modelo cristalográfico PDB:1VF1 que foi um de ΔG de -10 kcal/mol. Já para o atracamento com o ligante CDNB foram obtidos resultados de ΔG do *docking* (-8 kcal/mol) e do *redocking* (-11 kcal/mol) indicando uma afinidade entre a proteína e o ligante. O *docking* com o hidroperóxido de cumeno a melhor interação GST/CHP teve um valor de ΔG -6.11 kcal/mol.

Na parte dos experimentos *in vitro*, o vetor de expressão foi transformado em bactérias *E. coli* cepa BL21 (DE3) pLysS pelo método de choque térmico e a expressão da proteína foi induzida por adição de IPTG ao meio após 3 horas de cultivo. O sedimento bacteriano foi purificado com sucesso por cromatografia de afinidade de metal imobilizado utilizando coluna de níquel. O sucesso da purificação foi avaliado por SDS PAGE onde foi visualizada apenas uma banda no tamanho molecular de acordo com o esperado para GSTA garantindo assim a sua purificação. A proteína purificada passou pelo processo de diálise para retirada de imidazol.

Por meio de testes cinéticos foi possível comprovar que a enzima CgGSTA sintetizada por este estudo é funcional e apresentou atividade com os substratos CDNB e CHP. O teste de atividade de glutathione transferase com CDNB e a enzima recombinante foi realizado demonstrando valores diferentes do branco. Na avaliação cinética de Michaelis-Menten, a curva de saturação com substrato CDNB em concentração crescente e uma concentração fixa de GSH foi possível de ser alcançada quando utilizado 5 mM de GSH. A curva de saturação com concentrações crescentes de GSH e uma concentração fixa de CDNB foi realizada e os valores de k_m e V_{max} foram alcançados. A enzima rGSTA de ostra *C. gigas* mostrou atividade de glutathione peroxidase no teste realizado utilizando o substrato hidroperóxido de cumeno, e além disso, foi possível calcular os valores de k_m e V_{max} em um ensaio com curva cinética aumentando a quantidade de substrato (CHP).

Como perspectivas, o estudo abre a possibilidade da realização de mais testes cinéticos a fim de caracterizar a enzima e avaliar diferentes tipos de substratos descritos com atividade para as GST.

6. REFERÊNCIAS

- ALLARDYCE, C. S. *et al.* The role of tyrosine-9 and the C-terminal helix in the catalytic mechanism of Alpha-class glutathione S-transferases. **Biochemical Journal**, v. 343, n. 3, p. 525-531, 25 out. 1999.
- ALMAZROO, O. A; MIAH, M. K; VENKATARAMANAN, R. Drug metabolism in the liver. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 1-20, fev. 2017.
- ANDERSON, R. J. *et al.* Main-chain conformational tendencies of amino acids. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 60, n. 4, p. 679-689, 14 jul. 2005.
- ANDREW, S. M; TITUS, J. A; ZUMSTEIN, L. Dialysis and Concentration of Protein Solutions. **Current Protocols in Toxicology**, v. 10, n. 1, fev. 2001.
- ARAKAWA, S. *et al.* Methemoglobinemia induced by 1,2-Dichloro-4-nitrobenzene in mice with a disrupted Glutathione S-Transferase mu 1 gene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 9, p. 1545-1552, 18 jun. 2010.
- ARMSTRONG, R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 2-18, jan. 1997.
- ATTWOOD, T. K. *et al.* PRINTS and its automatic supplement, prePRINTS. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 400-402, 1 jan. 2003.
- AWASTHI, Y. C. **Toxicology of Glutathione Transferases**. 1. ed. Texas: CRC Press, 2006.
- AWASTHI, Y. C. *et al.* Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 5, p. 607-619, set. 2004.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411-421, 1 out. 1999.
- BATEMAN, A. *et al.* The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 90001, p. 138-141, 1 jan. 2004.
- BATTISTELLA, C. **Casan é multada em R\$15 milhões após alagamentos na Lagoa da Conceição**. 2021. Disponível em: <https://www.nsctotal.com.br/noticias/casan-e-multada-em-r-15-milhoes-apos-alagamentos-na-lagoa-da-conceicao>. Acesso em: 31 jan. 2022.
- BEBIANNI, M. J. *et al.* Transcriptional and cellular effects of paracetamol in the oyster *Crassostrea gigas*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 144, p. 258-267, out. 2017.
- BELIAEFF, B; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p.1316-1322, jun. 2002.
- BELL, E. W; ZHANG, Y. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and rmsd calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal Of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, 7 jun. 2019.

BENEDETTI, M. S. FAD-dependent enzymes involved in the metabolic oxidation of xenobiotics. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 69, n. 1, p. 45-52, jan. 2011.

BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 1 jan. 2000.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives In Science**, v. 1, n. 1-6, p. 41-55, maio 2014.

BITENCOURT-FERREIRA, G; AZEVEDO, W. F. Docking with SwissDock. **Methods in Molecular Biology**, p. 189-202, ago. 2019.

BJÖRNSTEDT, R. *et al.* Functional significance of arginine 15 in the active site of human class alpha glutathione transferase A1-1. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, n. 4, p. 765-773, abr. 1995.

BOARD, P. G. *et al.* Identification, characterization, and crystal structure of the omega class Glutathione Transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, p.24798-24806, 26 abr. 2000.

BOING, M - IBGE. **Típicos de Santa Catarina, moluscos estão pela primeira vez no Censo Agro**. 2019. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/19621-tipicos-de-santa-catarina-moluscos-estao-pela-primeira-vez-no-censo-agro>. Acesso em: 31 jan. 2022.

BONIFACIO, A. F; HUED, A. C. Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate based pesticides on structural biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Chemosphere**, v. 236, p. 124311, dez. 2019.

BORNHORST, J. A; FALKE, J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. **Methods in Enzymology**, v. 326, p. 245–54, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976.

BRESOLIN, I. T. L; MIRANDA, E. A; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009.

BROOKS, G. F. *et al.* **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

BRUNS, C. M. *et al.* Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. **Journal of Molecular Biology**, v. 288, n. 3, p.427-439, maio 1999.

CABEZÓN, E. *et al.* Towards an integrated model of bacterial conjugation. **Fems Microbiology Reviews**, p. 1-1, set. 2014.

CAJARAVILLE, M. P. *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p.295-311, mar. 2000.

CALVETE, C. L; CASEIRO, M. M; SOUZA C. B. Biotecnologia: transformação bacteriana por método de choque térmico. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, São Paulo, v. 12, n. 26, p. 41-53, mar. 2015.

CAMACHO, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. **Bmc Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 2009.

CARRONI, M; SAIBIL, H. R.. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. **Methods**, v. 95, p. 78-85, fev. 2016.

CHAN, W. *et al.* A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience Reports**, v. 33, n. 6, 1 dez. 2013.

CHANG, A. Y. *et al.* Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. **Jemi Methods**, v. 1, n. 1, p. 22-25, jun. 2017.

COLES, B. F.; KADLUBAR, F. F. Human alpha class Glutathione S-Transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease. **Methods in Enzymology**, p. 9-42, 2005.

COUSIAS, E. A; WESTER, M. J. RMSD and Symmetry. **Journal Of Computational Chemistry**, v. 40, n. 15, p. 1496-1508, 3 mar. 2019.

CROOM, E. Metabolism of xenobiotics of human environments. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, p. 31-88, 2012.

DALHOFF, K; JENSEN, K. B; POULSEN, H. E. Cancer and molecular biomarkers of Phase 2. **Methods In Enzymology**, p. 618-627, 2005.

DAR, A. M; MIR, S. Molecular Docking: approaches, types, applications and basic challenges. **Journal Of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 08, n. 02, 2017.

DECONTO, V. S. **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.

DEHOUCK, Y. *et al.* Fast and accurate predictions of protein stability changes upon mutations using statistical potentials and neural networks: popmusic-2.0. **Bioinformatics**, v. 25, n. 19, p. 2537-2543, 3 ago. 2009.

DIONISIO, F *et al.* The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. **Biology Letters**, v. 1, n. 2, p. 250-252, 4 maio 2005.

DOMINGUEZ, C; BOELEN, R; BONVIN, A. M. J. J. HADDOCK: A protein–protein docking approach based on biochemical or biophysical information. **Journal of The American Chemical Society**, v. 125, n. 7, p. 1731-1737, fev. 2003.

DONG, G. Q. *et al.* Prediction of substrates for Glutathione Transferases by covalent docking. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 6, p. 1687-1699, 16 maio 2014.

DOURADO, D. F. A. R. *et al.* Isomerization of Δ^5 -Androstene-3,17-dione into Δ^4 -Androstene-3,17-dione catalyzed by human Glutathione Transferase A3-3: a computational study identifies a dual role for glutathione. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 118, n. 31, p. 5790-5800, 28 abr. 2014.

DOURADO, D. F. A. R.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Glutathione Transferase classes alpha, pi, and mu: GSH activation mechanism. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 40, p. 12972-12980, 14 out. 2010.

DOURADO, D. F. A. R. *et al.* Glutathione Transferase A1-1: catalytic importance of arginine 15. **The Journal Of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 4, p. 1690-1697, 7 jan. 2010.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p.1792-1797, 8 mar. 2004.

ELSLIGER, M. A; WILSON, I. A. 1.8 Structure Validation and Analysis. **Comprehensive Biophysics**, p. 116-135, 2012.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Species Fact Sheets *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)**. Fisheries and Aquaculture Department, 2019.

FEDULOVA, N; RAFFALLI-MATHIEU, F; MANNERVIK, B. Characterization of porcine Alpha-class glutathione transferase A1-1. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 507, n. 2, p.205-211, mar. 2011.

FODOR, I. *et al.* A critical evaluation of some of the recent so-called 'evidence' for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 516, p. 110949-666, out. 2020.

FROGER, A; HALL, J. E. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. **Journal Of Visualized Experiments**, n. 6, 1 ago. 2007.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 4, p. 149-169, set. 2006.

GAGNÉ, F. **Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods**. USA: Academic Press, 2014. 282 p.

GASTEIGER, E. *et al.* **Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASy Server**. Totowa, Nj: Humana Press Inc, 2005.

GILDA, J. E; GOMES, A. V. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. **Analytical Biochemistry**, v. 440, n. 2, p. 186-188, set. 2013.

GILDENHUYS, S. *et al.* Arginine 15 stabilizes an SNAr reaction transition state and the binding of anionic ligands at the active site of human glutathione transferase A1-1. **Biophysical Chemistry**, v. 146, n. 2-3, p. 118-125, fev. 2010.

GILEADI, O. Recombinant protein expression in *E. coli*: a historical perspective. **Methods in Molecular Biology**, p. 3-10, 2017.

GOPAL, G. J; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, v. 32, n. 6, p. 419-425, 30 jul. 2013.

GOSLING, E. **Marine Bivalve Molluscs**. 2. ed. Uk: Wiley Blackwell, 2015.

GROSDIDIER, A; ZOETE, V; MICHELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p.270-277, 29 maio 2011.

GURUPRASAD, K; REDDY, B. V. B; 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 Eng**, v. 4, n. 2, p. 155-161, 1990.

HALLMANN, A. *et al.* Aromatisation of steroids in the bivalve *Mytilus trossulus*. **Peerj**, v. 7, p. 6953, 22 maio 2019.

HALPERN, B. S. *et al.* A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. **Science**, v. 319, n. 5865, p.948-952, 15 fev. 2008.

HALPERN, B. S. *et al.* Recent pace of change in human impact on the world's ocean. **Scientific Reports**, v. 11609, n. 9, 12 ago. 2019.

HALPERN, B. S. *et al.* Spatial and temporal changes in cumulative human impacts on the world's ocean. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p.1-11, 14 jul. 2015.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal Of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, jun. 1983.

HAYES, J. D; FLANAGAN, J. U; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p.51-88, 22 set. 2005.

HE, Q; SILLIMAN, B. R. Climate Change, Human Impacts, and Coastal Ecosystems in the Anthropocene. **Current Biology**, n. 29, p. 1021-1035, 7 out. 2019.

HOARAU, P. *et al.* Purification and partial characterization of seven glutathione S-transferase isoforms from the clam *Ruditapes decussatus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4359-4366, 28 ago. 2002.

HUBATSCH, I; RIDDERSTRÖM, M; MANNERVIK, B. Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. **Biochemical Journal**, v. 330, n. 1, p.175-179, 15 fev. 1998.

HUGGETT, R, J. *et al* (ed.). **Biomarkers**: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Crc Press, 2018.

ILLERGÅRD, K; ARDELL, D. H; ELOFSSON, A. Structure is three to ten times more conserved than sequence-A study of structural response in protein cores. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 77, n. 3, p. 499-508, 15 nov. 2009.

JOHANSSON, A; MANNERVIK, B. Human Glutathione Transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 35, p. 33061-33065, 20 jun. 2001.

JOHNSON, K. A. A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. **Febs Letters**, v. 587, n. 17, p. 2753-2766, 11 jul. 2013.

JOHNSON, K. A; GOODY, R. S. The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. **Biochemistry**, v. 50, n. 39, p. 8264-8269, 4 out. 2011.

KALITA, J. *et al*. Comprehensive analysis of the catalytic and structural properties of a mu-class glutathione s-transferase from *Fasciola gigantica*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, dez. 2017.

KAUR, J; KUMAR, A; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803-822, jan. 2018.

KHAN, S. *et al*. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International Journal of Genomics**, v. 2016, p. 1-14, 2016.

KIM, J. E. *et al*. Functional characterization of Alpha-Class Glutathione S-Transferases from the Turkey (*Meleagris Gallopavo*). **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 1, p.45-53, 29 ago. 2011.

KIM, S. *et al*. PubChem Substance and Compound databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 1202-1213, 22 set. 2015.

KONISHI, T. *et al*. Molecular cloning and characterization of α -class glutathione S-transferase genes from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 3-4, p.309-320, mar. 2005.

KUFAREVA, I; ABAGYAN, R. Methods of Protein Structure Comparison. **Methods In Molecular Biology**, p. 231-257, 2011.

LAFONT, R; MATHIEU, M. Steroids in aquatic invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 109-130, 20 jan. 2007.

LASKOWSKI, R. A; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal Of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778-2786, 5 out. 2011.

LAWLESS, M. J. *et al*. ESR Resolves the C Terminus Structure of the Ligand-free Human Glutathione S-Transferase A1-1. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 3, p. 592-601, fev. 2018.

LAWRENCE, R. A; BURK, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 71, n. 4, p. 952-958, ago. 1976.

LIAO, W. Q. *et al.* Molecular cloning and characterization of alpha-class glutathioneS-transferase gene from the liver of silver carp, bighead carp, and other major chinese freshwater fishes. **Journal Of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 114-126, 2006.

LINDSTRÖM, H. *et al.* Characterization of equine GST A3-3 as a steroid isomerase. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 178, p. 117-126, abr. 2018.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 120, n. 1, p.43-49, maio 1998.

LOHNING, A. E. *et al.* A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, 7 jun. 2017.

LOTAN, I; SCHWARZER, F; LATOMBE, J. Efficient Energy Computation for Monte Carlo Simulation of Proteins. **Lecture Notes in Computer Science**, p. 354-373, 2003.

LOUGHRAN, S. T; BREE, R. T; WALLS, D. Purification of polyhistidine-tagged proteins. **Methods in Molecular Biology**, p. 275-303, 12 out. 2016.

LU, Y. *et al.* Major threats of pollution and climate change to global coastal ecosystems and enhanced management for sustainability. **Environmental Pollution**, v. 239, p.670-680, ago. 2018.

LÜCHMANN, K. H. *et al.* A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324-334, jul. 2014.

LUCKENBACH, T; EPEL, D. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. **American Journal of Physiology-regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 6, p. 1919-1929, jun. 2008.

LUZ, A. **Cobertura da rede de esgoto é de 67% em Florianópolis, segundo a Casan**: Já o tratamento dos dejetos chega a apenas 46% do que é coletado na Capital, mostra levantamento do Instituto Trata Brasil. 2020. Disponível em: <<https://ndmais.com.br/noticias/cobertura-da-rede-de-esgoto-e-de-67-em-florianopolis-segundo-a-casan/>>. Acesso em: 03 mar. 2021.

MAITI, R. *et al.* SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. 590-594, 1 jul. 2004.

MANNERVIK, B. Optimizing the Heterologous Expression of Glutathione Transferase. **Methods In Enzymology**, p. 254-265, 2005.

MANNERVIK, B; DANIELSON, U. H; KETTERER, B. Glutathione Transferases - structure and catalytic activity. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 23, n. 3, p. 283-337, jan. 1988.

MANNERVIK, B; JEMTH, P. Measurement of Glutathione Transferases. **Current Protocols in Toxicology**, v. 14, n. 1, maio 2002.

MAO, Y. *et al.* Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sangou Bay, China. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 322-333, mar. 2006.

MARTIN, J. L. Thioredoxin —a fold for all reasons. **Structure**, v. 3, n. 3, p. 245-250, mar. 1995.

MARTINEZ-LARA, E; LEAVER, M; GEORGE, S. Evidence from heterologous expression of glutathione S-transferases A and A1 of the plaice (*Pleuronectes platessa*) that their endogenous role is in detoxification of lipid peroxidation products. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3-5, p. 263-266, set. 2002.

MARTINS, J. *et al.* 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.

MFEKA, M.S. *et al.* Comparative analyses and structural insights of new class glutathione transferases in *Cryptosporidium* species. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 23 nov. 2020.

MIOSSEC, L; LeDEUFF, R-M; GOULLETQUER, P. **Alien species alert: *Crassostrea gigas*** (Pacific oyster). ICES Cooperative Research Report No.299, 42 pp. 2009.

MOORE, M. N *et al.* An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552, n. 1-2, p. 247-268, ago. 2004.

MORRIS, G. M; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. **Methods In Molecular Biology**, p. 365-382, 2008.

NEBERT, D. W; VASILIOU, V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. **Human Genomics**, v. 1, n. 6, p.460, 2004.

NELSON, D. L; COX, M. M. (ed.). **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEUMANN, B. *et al.* Future coastal population growth and exposure to sea-level rise and coastal flooding - A global assessment. **Plos One**, v. 10, n. 3, 11 mar. 2015.

NSC TV; G1 SC. **Prefeitura estipula multa de R\$ 3,2 milhões à Casan por vazamento de esgoto na Lagoa da Conceição, em Florianópolis. 2020.** Disponível em: <https://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/2020/05/20/prefeitura-estipula-multa-de-r-32-milhoes-a-casan-por-vazamento-de-egoto-em-lagoa-da-conceicao-em-florianopolis.ghtml>. Acesso em: 26 maio 2020.

OAKLEY, A. Glutathione transferases: a structural perspective. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, n. 2, p.138-151, 23 mar. 2011.

OVERTON, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 5, p. 590-601, maio 2014.

PANJA, S. *et al.* How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? **Molecular Membrane Biology**, v. 25, n. 5, p. 411-422, jan. 2008.

PARENTE, T. E. M; HAUSER-DAVIS, R. A. The use of fish biomarkers in the evaluation of water pollution. In: ALMEIDA, E. A. de; RIBEIRO, C. A. de Oliveira (Ed.). **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems**. Boca Raton: CRC Press, 2014.

PASTORE, A. *et al.* Purification and characterization of a novel alpha-class glutathione transferase from human liver. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, n. 11, p.1235-1243, nov. 1998.

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, p.749-754, 1 nov. 1996.

PESARRODONA, M; UNZUETA, U; VÁZQUEZ, E. Dialysis: a characterization method of aggregation tendency. **Methods In Molecular Biology**, p. 321-330, 16 nov. 2014.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p.1605-1612, 2004.

PETTERSSON, P. L; JOHANSSON, A; MANNERVIK, B. Transmutation of human Glutathione Transferase A2-2 with peroxidase activity into an efficient steroid isomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 30019-30022, 21 maio 2002.

RAMACHANDRAN, G.N; RAMAKRISHNAN, C; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal Of Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95-99, jul. 1963.

RAND, G. M. **Effects, environmental fate, and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, 1125 p. 1995.

RANSON, H; HEMINGWAY, J. Mosquito Glutathione Transferases. **Methods in Enzymology**, p. 226-241, 2005.

REMENTERIA, A. *et al.* Assessment of health status of oysters (*Crassostrea gigas*) exposed to environmentally relevant concentrations of Ag and Cu in brackish waters. **Journal of Sea Research**, v. 130, p. 229-238, dez. 2017.

RIOULT, D. *et al.* The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 153, p. 98-109, ago. 2014.

ROBIN, S. K. D; ANSARI, M; UPPUGUNDURI, C. R. S. Spectrophotometric Screening for Potential Inhibitors of Cytosolic Glutathione S-Transferases. **Journal Of Visualized Experiments**, n. 164, 10 out. 2020.

RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. J. *et al.* Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from South-Spanish littoral. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p.542-549, mar. 2002.

ROY, A; KUCUKURAL, A; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725-738, 25 mar. 2010.

SACCO, J. C. **Phase II biotransformation of xenobiotics in polar bear (*Ursus maritimus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*)**. 2006. 170 f. Tese (doutorado) - University of Florida, Flórida.

SALINAS A. E, WONG M. G. Glutathione S-transferases- a review. **Curr Med Chem**, v. 6(4), p.279-309, apr. 1999.

SCHRÖDINGER, L; DeLANO, W. **The PyMOL Molecular Graphics System**, Version 2.0, 2020.

SCOTT, A. P. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. **Steroids**, v. 77, n. 13, p. 1450-1468, nov. 2012.

SCOTT, A. P. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects. **Steroids**, v. 78, n. 2, p. 268-281, fev. 2013.

SCOTT, A. P. Is there any value in measuring vertebrate steroids in invertebrates? **General and Comparative Endocrinology**, v. 265, p. 77-82, set. 2018.

SEKOVSKI, I; NEWTON, A; DENNISON, W. 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, jan. 2012.

SHARMA, R. *et al.* Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.6, p.289-300, 1 abr. 2004.

SHEEHAN, D. *et al.* Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 1, 15 nov. 2001.

SHIREMAN, L. M. *et al.* Glutathione transferase A4-4 resists adduction by 4-hydroxynonenal. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 504, n. 2, p. 182-189, dez. 2010.

SILVA, L. X; BASTOS, L. L; SANTOS, L. H. Modelagem computacional de proteínas. **Bioinfo - Revista Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional**, jul. 2021.

SINNING, I. *et al.* Structure Determination and Refinement of Human Alpha Class Glutathione Transferase A1-1, and a Comparison with the Mu and Pi Class Enzymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 232, n. 1, p. 192-212, jul. 1993.

SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 17, n. 4, p. 355-362, dez. 1993.

SOBOLEV, O. V. *et al.* A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. **Structure**, v. 28, n. 11, p. 1249-1258, nov. 2020.

SOLETTI, L. V. Uma Abordagem Sobre a Qualidade de Modelos Estruturais 3D de Proteínas Geradas com as Ferramentas I-Tasser e Swiss-Model. **Brazilian Journal of Bioinformatics**, 2015.

SORANZO, N. *et al.* Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 271, n. 5, p. 511-521, 7 abr. 2004.

SOUSA, S. F; FERNANDES, P. A; RAMOS, M. J. Protein-ligand docking: current status and future challenges. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 15-26, 21 jul. 2006.

SOUZA, D. S. M. *et al.* Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 153-161, fev. 2012.

THORSON, J. S. *et al.* Analysis of the Role of the Active Site Tyrosine in Human Glutathione Transferase A1-1 by Unnatural Amino Acid Mutagenesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 2, p. 451-452, 1 jan. 1998.

TRISCIANI, A. *et al.* Phase I and II biotransformation enzymes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) collected in front of an oil refinery. **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 29-36, ago. 2012.

UEDA, H. *et al.* Phase-II conjugation ability for PAH metabolism in amphibians: characteristics and inter-species differences. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3-4, p. 337-343, out. 2011.

VAN DER OOST, R; BEYER, J; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p.57-149, 2003.

VAN ZUNDERT, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2.2 Web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. **Journal of Molecular Biology**, v.428, n.4, 720-725, fev. 2016.

VARGAS, E. **A influência do Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC na maricultura catarinense.** 2019. Disponível em: <http://floripamanha.org/2019/08/a-influencia-do-laboratorio-de-moluscos-marinhos-da-ufsc-na-maricultura-catarinense/>. Acesso em: 27 maio 2020.

VARGO, M. A; NGUYEN, L; COLMAN, R. F. Subunit interface residues of GlutathioneS-Transferase A1-1 that are important in the monomer–dimer equilibrium. **Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 3327-3335, mar. 2004.

VERLI, H. (org.). **Bioinformática: Da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - Sbbq, 2014.

VIDAL, M. L. *et al.* Purification and characterisation of glutathione S-transferases from the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 131, n. 4, p. 477-489, abr. 2002.

VILAS-BÔAS, L. O. B. **Caracterização Estrutural e Funcional da Isoforma Glutathione S-transferase Ômega 2.1, Recombinante, de ostra *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793)**. 2022. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

VRIES, S. J de; VAN DIJK, M; BONVIN, A. M J J. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. **Nature Protocols**, v. 5, n. 5, p. 883-897, 15 abr. 2010.

WALLACE, L. A; DIRR, H. W. Folding and Assembly of Dimeric Human Glutathione Transferase A1-1. **Biochemistry**, v. 38, n. 50, p. 16686-16694, 24 nov. 1999.

WALKER, C. H. *et al.* **Principles of Ecotoxicology**. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2001.

WANG, C. Complementary DNA cloning, protein expression, and characterization of alpha-class GSTs from *Macaca fascicularis* liver. **Toxicological Sciences**, v. 70, n. 1, p.20-26, 1 nov. 2002.

WANG, C. *et al.* CDNA cloning and mRNA expression of four glutathione S-transferase (GST) genes from *Mytilus galloprovincialis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 2, p. 697-703, fev. 2013.

WANG, X. *et al.* Nanopore sequencing and De Novo assembly of a black-hhelled pacific oyster (*Crassostrea gigas*) genome. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 22 nov. 2019.

WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p.296-303, 21 maio 2018.

WATERHOUSE, A. M. *et al.* Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics: APPLICATIONS NOTE**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, jan. 2009.

WHITFORD, D. **Proteins: Structure and Function**. Inglaterra: John Wiley & Sons, 2005.

WIEDERSTEIN, M; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 1, p. 407-410, 8 maio 2007.

WILKINSON, J. H. Enzyme kinetics and its relevance to enzyme assay. **Journal of Clinical Pathology**, v. 24, n. 4, p. 14–21, 1 jan. 1971.

WLODAWER, A. Stereochemistry and Validation of Macromolecular Structures. **Methods In Molecular Biology**, p. 595-610, 2017.

WONGSANTICHON, J; KETTERMAN, A. J. An intersubunit lock-and-key ‘Clasp’ motif in the dimer interface of Delta class glutathione transferase. **Biochemical Journal**, v. 394, n. 1, p. 135-144, 27 jan. 2006.

WU, D; WU, Z. Superimposition of protein structures with dynamically weighted RMSD. **Journal Of Molecular Modeling**, v. 16, n. 2, p. 211-222, 1 jul. 2009.

WU, S; ZHANG, Y. LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 10, p. 3375-3382, maio 2007.

YANG, H. L. *et al.* Molecular cloning, expression and characterization of glutathione S-transferase from *Mytilus edulis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, n. 2, p. 175-182, out. 2004.

YANG, J; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p. 174-181, 16 abr. 2015.

YANG, Y. *et al.* Role of Glutathione S-Transferases in protection against lipid peroxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 22, p. 19220-19230, 7 mar. 2001.

ZACCHI, F. L. **Respostas moleculares e de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) expostas a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e diferentes salinidades.** 2017. 205 f. Tese (Doutorado) - Curso de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

ZERBS, S; GIULIANI, S; COLLART, F. Small-Scale Expression of Proteins in *E. coli*. **Methods In Enzymology**, p. 117-131, 2014.

ZHANG, G. *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p.49-54, 19 set. 2012.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **Bmc Bioinformatics**, , v. 9, n. 1, 23 jan. 2008.

ZHANG, Y; KOLINSKI, A; SKOLNICK, J. TOUCHSTONE II: a new approach to ab initio protein structure prediction. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 2, p. 1145-1164, ago. 2003.

ZHANG, Y; SKOLNICK, J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 57, n. 4, p. 702-710, 2004.

ZHANG, Y; SKOLNICK, J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the tm-score. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 7, p. 2302-2309, 11 abr. 2005.

ZHAO, T. *et al.* The role of human Glutathione S-Transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 367, n. 2, p. 216-224, jul. 1999.

ZHENG, W. *et al.* LOMETS2: improved meta-threading server for fold-recognition and structure-based function annotation for distant-homology proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 429-436, 13 maio 2019.

APÊNDICE A

ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA COMPLEMENTARES

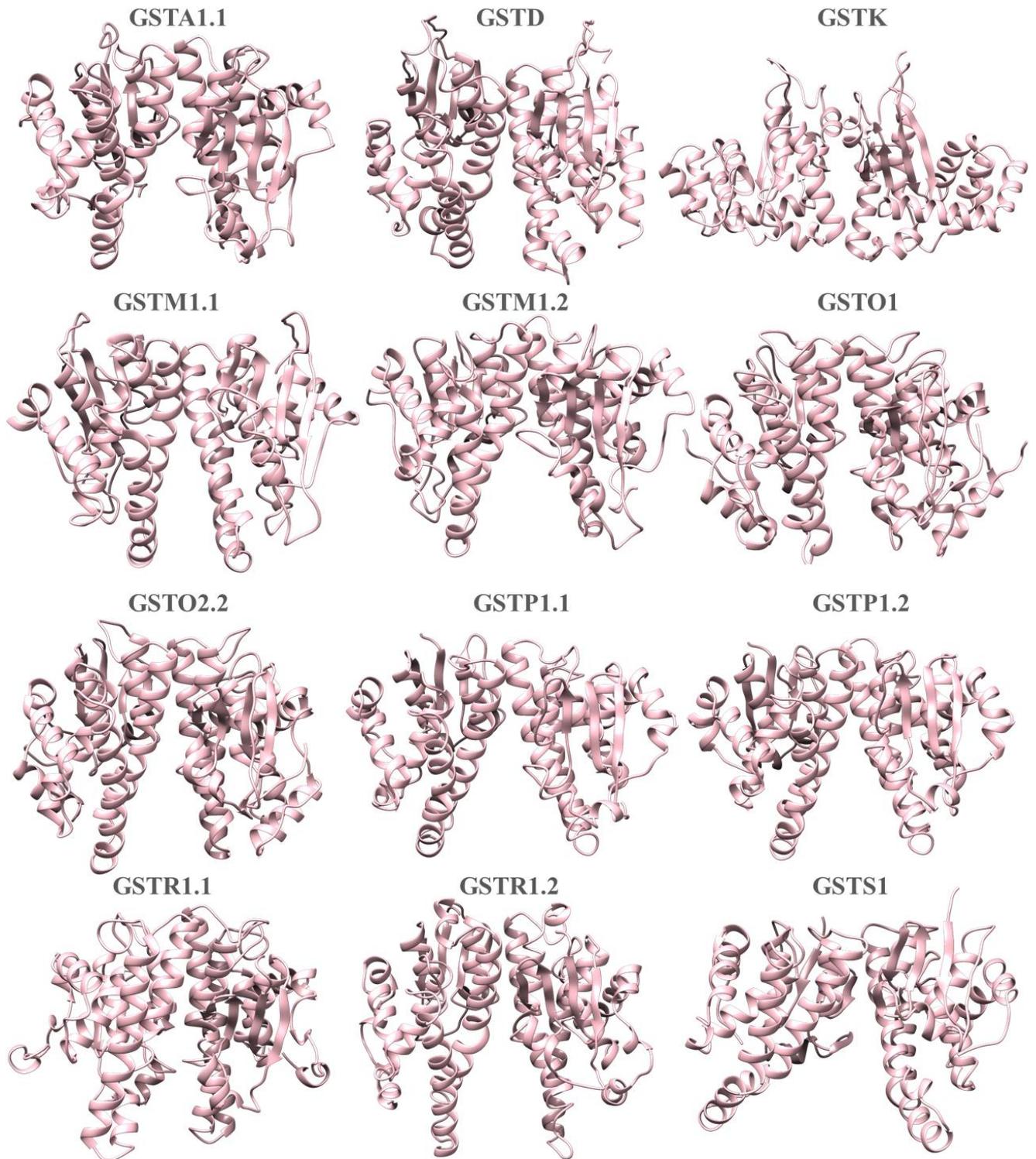
Em estudos prévios realizados no LABCAI foram identificadas 24 sequências de GSTs para ostra do Pacífico *C. gigas*. Este trabalho possui ênfase na caracterização da classe alfa isoforma 1.2, porém de forma adicional, foram realizadas análises de bioinformática para todas as sequências citosólicas classificadas.

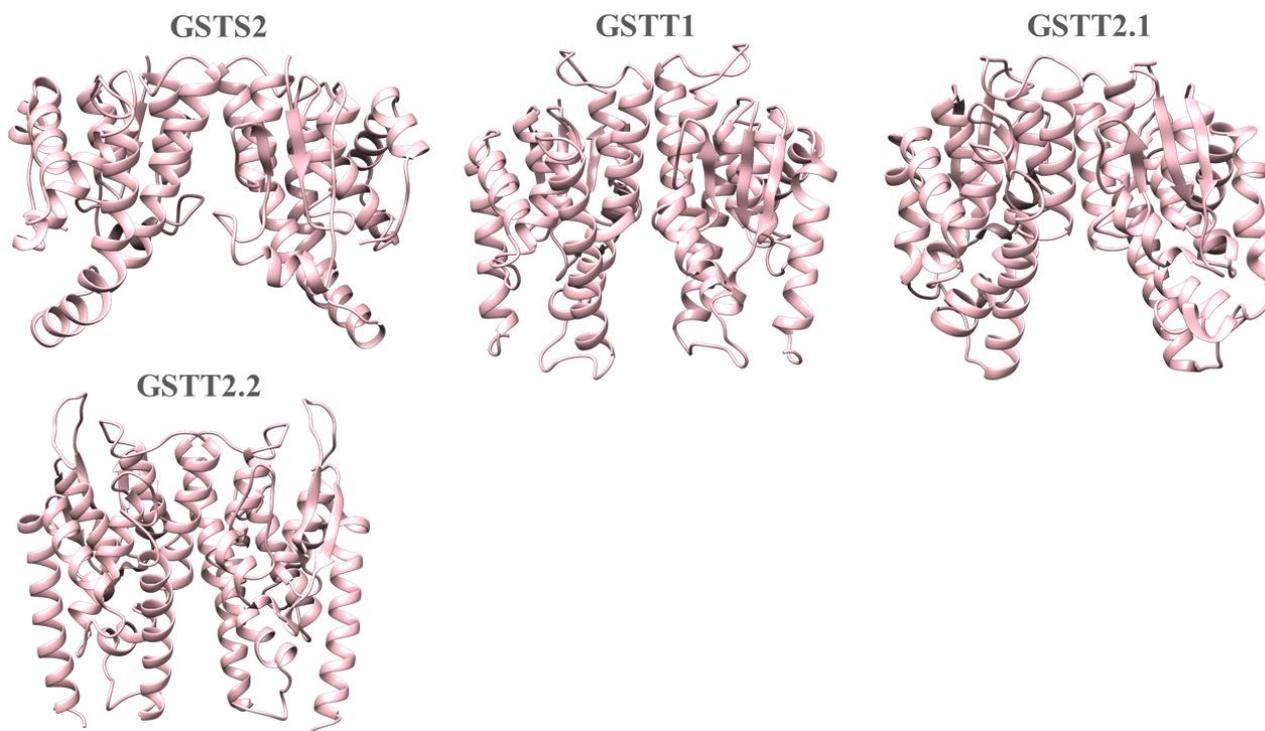
Foram executadas predições dos modelos tridimensionais e de *docking* molecular para as sequências de GSTs citosólicas. Dezesesseis isoformas da enzima foram analisadas de forma *in silico*, sendo elas: da classe alfa a GSTA1.1; classe delta GSTD; classe kappa GSTK; classe mi GSTM1.1, GSTM1.2; classe ômega GSTO1, GSTO2.2; classe pi GSTP1.1, GSTP1.2; classe rho GSTR1.1, GSTR1.2; classe sigma GSTS1, GSTS2; classe teta GSTT1, GSTT2.1, GSTT2.2. Ainda há mais uma isoforma da classe ômega, CgGSTO2.1, porém como esta já foi caracterizada estrutural e funcionalmente de forma específica no estudo de Vilas-Bôas, (2022), não consta nesta análise.

As sequências tiveram seu modelo 3D construído pelo I-TASSER por meio de sua sequência de aminoácidos. Da mesma forma que para a isoforma GSTA1.2 já relatada, todas as enzimas do estudo tiveram seus modelos construídos em forma de monômeros e por este motivo foi necessário a realização do *docking* proteína-proteína pela ferramenta HADDOCK para obter suas formas diméricas (Figura 1). A qualidade da topologia das estruturas foi verificada através da comparação com estruturas referência depositadas no PDB. Além disso, foram avaliados os valores de C-score e TM-score, RMSD e HADDOCK Score, que os programas de modelagem e *docking* fornecem para a escolha do melhor resultado gerado por elas.

Na Figura 1 é possível observar as características especiais de topologia para cada classe e isoformas com suas diferentes composições de estrutura em folhas β e α hélices. Como, por exemplo, quando comparamos a estrutura da GST kappa com a proteína da GST teta 2.2 que possuem uma característica ampla parecida, porém com suas peculiaridades de formação das estruturas secundárias, tornando a sua conformação claramente diferente.

Figura 1. Modelos tridimensionais construídos para as GSTs identificadas de ostras do Pacífico *C. gigas*, isoformas: GSTA1.1, GSTD, GSTK, GSTM1.1, GSTM1.2, GSTO 1, GSTO2.2, GSTP1.1, GSTP1.2, GSTR1.1, GSTR1.2, GSTS1, GTS2, GSTT1, GSTT2.1, GSTT2.2.





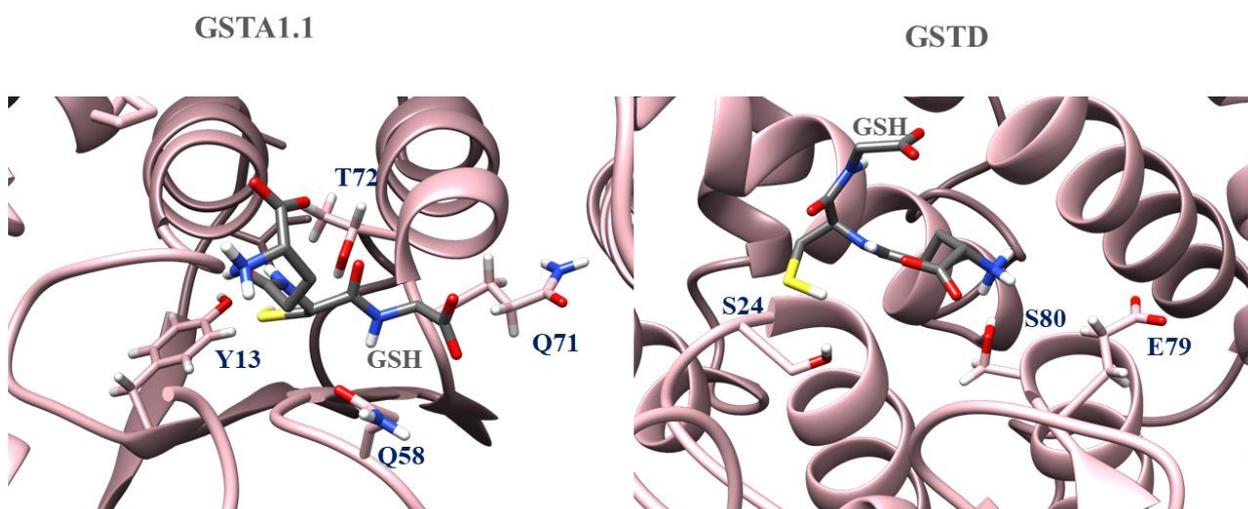
Os modelos construídos passaram então pela predição da posição de encaixe com o ligante, a molécula de glutathiona reduzida (GSH). Os *dockings* foram realizados pelo programa *online* SwissDock. O ligante utilizado na técnica, GSH, foi retirado do banco de dados de proteínas PDB. Para realizar a delimitação da caixa de atracamento, bem como para interpretar os resultados, foram pesquisados os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na interação e estabilização do ligante no bolsão de ligação. Na Tabela 1 estão descritos esses aminoácidos conhecidos na literatura pelo envolvimento da GST com a GSH. Esses resíduos específicos presentes no sítio catalítico são um dos critérios que ajudam a classificar as GSTs dentro de suas classes (AWASTHI, 2006; FROVA, 2006). As isoformas das classes alfa, mi, pi e sigma possuem um resíduo de tirosina na sua região de estabilização da GSH, além da arginina 15 para as enzimas da classe alfa, que fazem uma interação adicional no sítio ativo. As classes teta, delta e rho possuem uma serina e já na classe ômega é encontrado um resíduo de cisteína para estabilizar o grupo tiol da GSH (AWASTHI, 2006; BOARD *et al.*, 2000; OAKLEY, 2011).

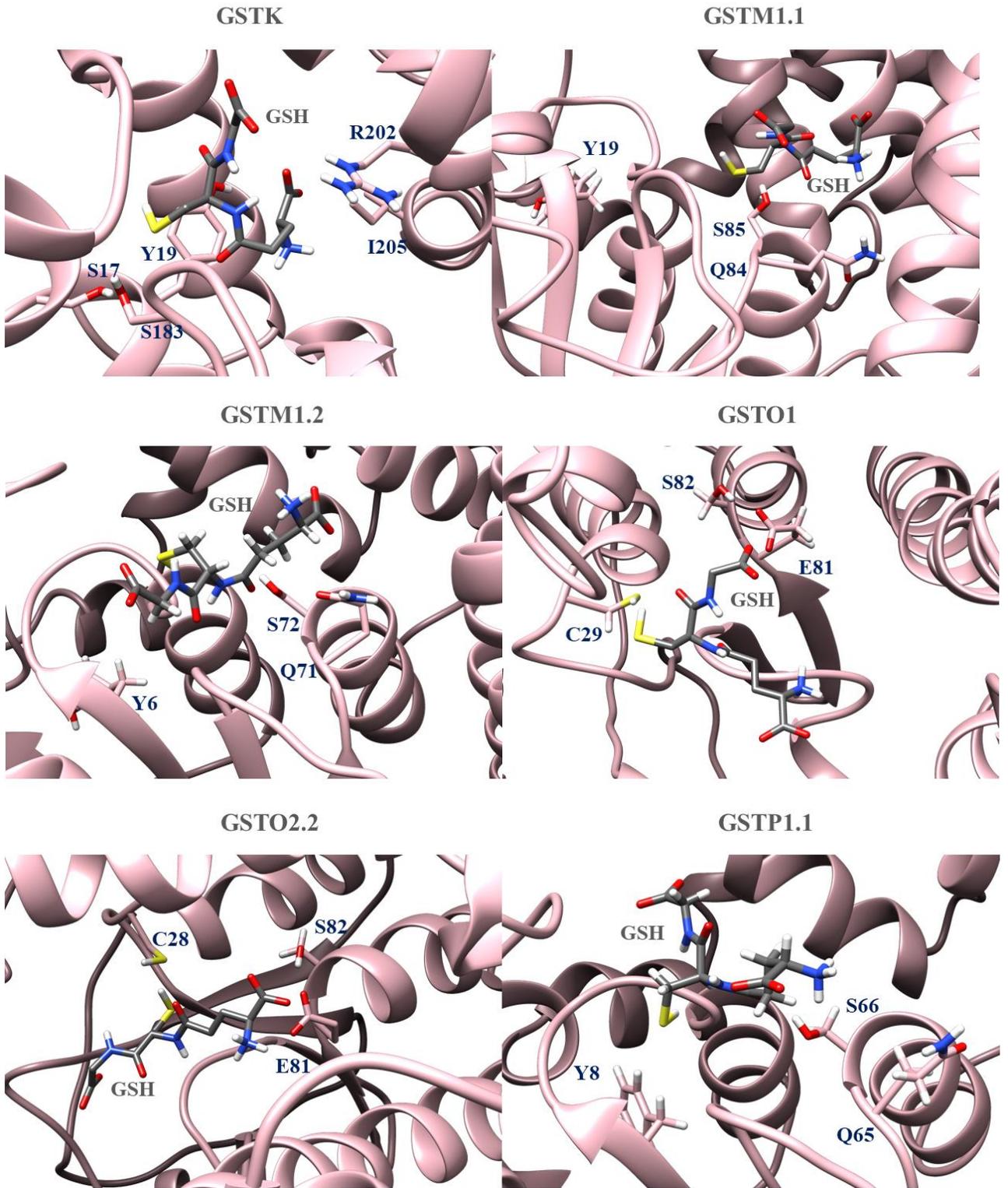
Tabela 1. Aminoácidos das classes de GSTs envolvidos na interação com a GSH.

Classes	Motivo $\beta\beta\alpha$	Região de estabilização
Teta	Glutamato e Serina	Serina
Ômega	Glutamato e Serina	Cisteína
Delta	Glutamato e Serina	Serina
Rho	Glutamato e Serina	Serina
Sigma	Glutamina e Serina	Tirosina
Mi	Glutamina e Serina	Tirosina
Pi	Glutamina e Serina	Tirosina
Alfa	Glutamina e Treonina	Tirosina + arginina

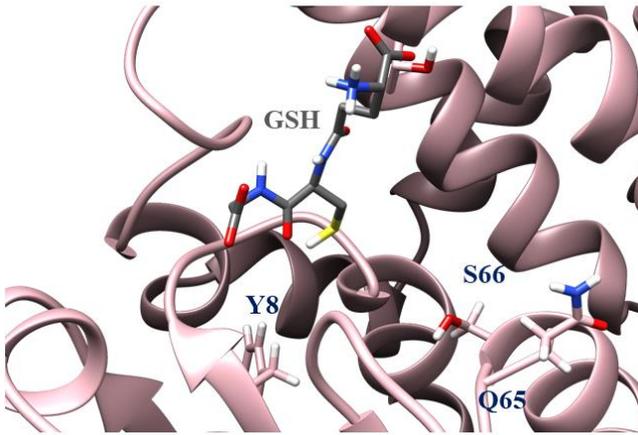
Os *dockings* (Figura 2) realizados pelo SwissDock com a molécula de GSH tiveram seus resultados selecionados segundo a proximidade com os aminoácidos da Tabela 1 e pela similaridade com estruturas cristalográficas de referência para cada classe que foram selecionadas por identidade contra o banco de dados PDB.

Figura 2. *Docking* molecular das 16 isoformas citosólicas de GSTs de *C. gigas* (em rosa) com a molécula de glutationa reduzida GSH (em cinza) e em destaque estão as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação.

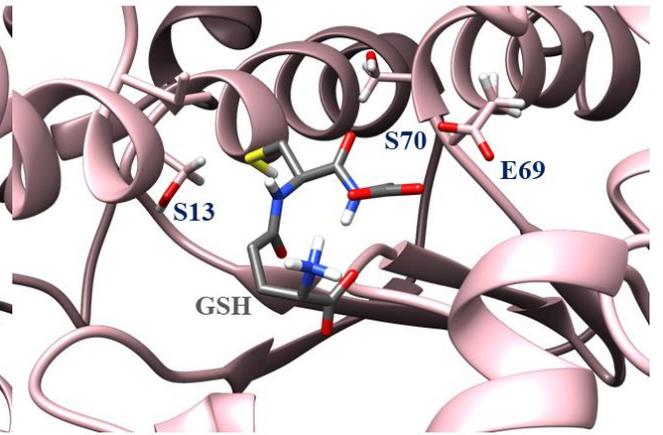




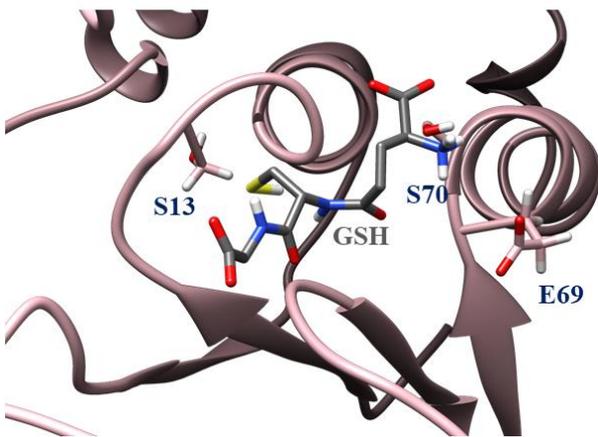
GSTP1.2



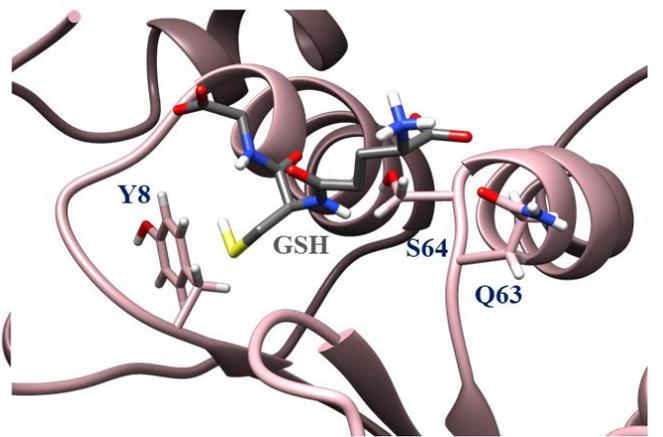
GSTR1.1



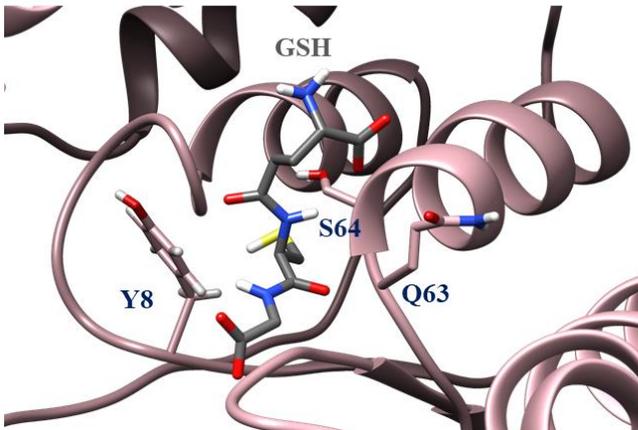
GSTR1.2



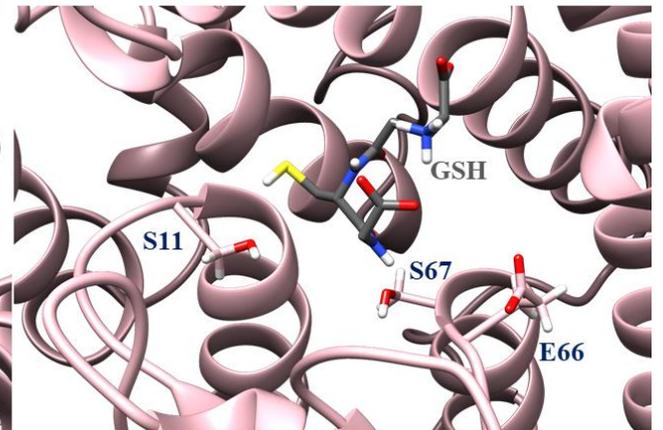
GSTS1

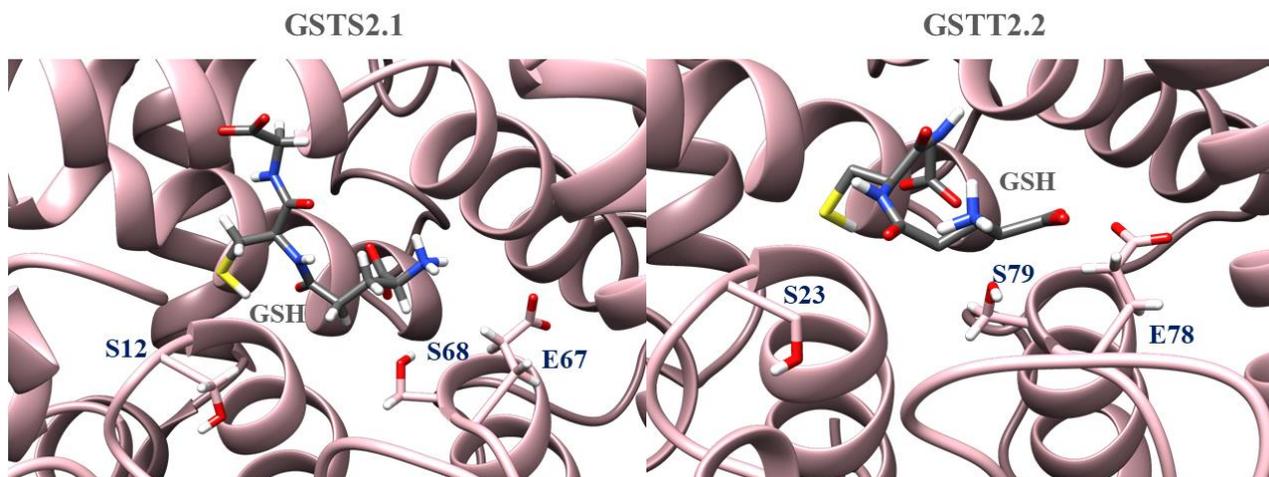


GSTS2



GSTT1





Além dos parâmetros de proximidade com a estrutura cristalográfica e com os aminoácidos conhecidos para cada classe descritos na tabela 1, os *dockings* tiveram seus resultados selecionados também através dos valores de ΔG , descritos na tabela 2. É possível constatar que os valores obtidos são negativos, o que sugere que as interações entre as GSTs e o ligante (GSH) são espontâneas, e assim, são possíveis de acontecer. Além disso, possuem valores de ΔG próximos aos obtidos para CgGSTA1.2 (-7,17 kcal/mol) caracterizada neste estudo.

Tabela 2. Valores de ΔG dos *dockings* entre as diferentes classes de GSTs citosólicas contra o ligante GSH.

Isoforma	ΔG (GSH) em kcal/mol
GSTA 1.1	-6.9
GSTD	-5.93
GSTK	-6.8
GSTM1.2	-6.4
GSTM1.1	-7.6
GSTO 1	-6.98
GSTO 2.2	-6.9
GSTP 1.1	-7.1

GSTP 1.2	-7.2
GSTR 1.1	-6.8
GSTR 1.2	-7.12
GSTS 1	-7.8
GSTS 2	-6.5
GSTT 1	-7.2
GSTT 2.1	-8.0
GSTT 2.2	-8.2

Essas análises, quando corroboradas às análises de transcrição gênica já realizadas (DECONTO, 2019), e futuras análises *in vitro* complementares de avaliação de ligantes proteicos, contribuem para a consolidação da classificação estrutural da família das GSTs de *Crassostrea gigas* e facilitarão a escolha e uso de isoformas específicas de Glutathione S-transferases em estudos ecotoxicológicos, além de estudos mais específicos acerca da fisiologia e biologia dos organismos bivalves.