



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

Tâmela Zamboni Madaloz

**Diversidade Estrutural da Superfamília de Receptores Nucleares da Ostra do Pacífico:**  
*Análise in silico* de Candidatos à Ligação com Estradiol.

Florianópolis

2022

Tâmela Zamboni Madaloz

**Diversidade Estrutural da Superfamília de Receptores Nucleares da Ostra do Pacífico:**

*Análise in silico* de Candidatos à Ligação com Estradiol.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Guilherme Razzera, Dr.

Florianópolis

2022

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

Madaloz, Tâmeda Zamboni

Diversidade Estrutural da Superfamília de Receptores Nucleares da Ostra do Pacífico : Análise in silico de Candidatos à Ligação com Estradiol. / Tâmeda Zamboni Madaloz ; orientador, Guilherme Razzera, 2022.

101 p.

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

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Dinâmica Molecular. 3. Ecotoxicologia. 4. Modelagem 3D. 5. Bioinformática. I. Razzera, Guilherme . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Tâmela Zamboni Madaloz

**Diversidade Estrutural da Superfamília de Receptores Nucleares da Ostra do Pacífico: Análise *in silico* de Candidatos à Ligação com Estradiol.**

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

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

Flávia Lucena Zacchi, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Guilherme Razzera, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Sandra e Junior, por todo o apoio, pelo incentivo e por acreditarem e investirem em mim. Agradeço à companheira do meu pai, Liliana, pela troca de ideias e conselhos e aos meus irmãos Willian e Matheus, que são parte de mim. Um agradecimento especial e caloroso para a minha vózinha e mãe, Maria Nair, por todo o amor, carinho, acolhimento, colo e encorajamento, faz toda a diferença na minha vida. Agradeço a todos da minha família que estiveram comigo e me apoiaram nessa jornada.

Agradeço muito à minha grande amiga e colega que me acompanha desde o início da jornada na UFSC, Isaura, pelo companheirismo, pela troca, crescimento, paciência e cuidado. Não posso deixar de agradecer à Jujuba, Eva e Chicória, animais não humanos que dividem apartamento comigo e trazem suavidade e riso nos momentos mais difíceis, tornando meus dias mais coloridos sempre.

Agradeço ao meu orientador, Guilherme Razzera, pelas reuniões, pelas conversas, por priorizar qualidade à quantidade, por respeitar as limitações dos seus alunos e sempre levar em conta nossas ideias e considerações, inclusive respeitando meus posicionamentos éticos.

Agradeço às amigas e colegas de laboratório, Glorister, Julia, Luiz, Theo e Vanessa pela construção conjunta e colaboração nos trabalhos. Um agradecimento especial para a amiga e colega de laboratório Karin, que me acolheu desde o início da minha empreitada na bioinformática, me ensinou e me ensina muito e está sempre disponível para trocar uma ideia e compartilhar todos os conhecimentos dela sobre essa área incrível.

Agradeço aos amigos da biologia da UFSC, Adriana e Victor, pelas trocas que tivemos e pela grande contribuição na construção do meu eu bióloga, pesquisadora e professora. Aos amigos das antigas, Suéllen, Thais e Lucas, pelas conversas, incentivo e carinho.

Um agradecimento a todos os professores que tive contato em minha formação. Os caminhos que tomei e as possibilidades que vislumbro têm grande influência de todos vocês. Certamente, ter realizado praticamente todo o meu mestrado no período de distanciamento social da pandemia de covid-19 limitou meu contato e interação com outros colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. No entanto, no pouco contato que tive, em aulas online e na organização de um evento, a troca foi enriquecedora. Que muitas colaborações, troca de experiências e mesas de bar possam vir pela frente.

Um agradecimento ao Sci-Hub, por possibilitar meu acesso a diversos artigos importantes para a construção desta dissertação e pela tentativa de “remover todas as barreiras no caminho da ciência”, parafraseando o próprio site.

Por fim, gostaria de enaltecer o privilégio que possuo de fazer parte da Universidade Federal de Santa Catarina, uma instituição de excelência que promove educação pública, gratuita e de qualidade. Agradeço também à CAPES, pelo salário de pesquisadora nível mestrado, que viabilizou financeiramente a permanência e desenvolvimento do mestrado em Florianópolis.

*“Não é possível agora - e nunca será - dizer ‘eu renuncio’. Nem seria uma boa coisa para a literatura, se fosse possível. Essa geração precisa fazer um grande esforço para que a próxima possa ter um avanço suave. Pois eu concordo com você em que nada será alcançado por nós. Fragmentos - parágrafos -, uma página talvez: mas nada mais. [...] A alma humana, parece-me, se reorienta de vez em quando. Agora ela está fazendo isso. Portanto, ninguém pode ver integralmente. O melhor de nós tem um vislumbre de um nariz, um ombro, algo que se desvia, sempre em movimento. Ainda assim me parece melhor entender esse vislumbre.”*

*(Virginia Woolf para Gerald Brenan. apud Carol J. Adams)*

## RESUMO

A crescente presença de contaminantes de origem antrópica em ambientes aquáticos representa desafios para as espécies que habitam locais contaminados. A superfamília dos receptores nucleares de animais, devido às características estruturais de ligação com ligantes que inibem ou induzem a transcrição de genes, são frequentes alvos de compostos xenobióticos. O presente trabalho busca entender o potencial de interação entre o hormônio estradiol, enquanto contaminante ambiental, e os receptores nucleares de *Crassostrea gigas*, a ostra do Pacífico, uma espécie filtradora e sésil, sujeita a mudanças ambientais e exposição a contaminantes. Na ostra do Pacífico, o receptor nuclear homólogo ao receptor de estrógeno de vertebrados não é capaz de ligar ao hormônio estradiol como ocorre em vertebrados. Possivelmente, outro receptor apresenta capacidade de responder a moléculas semelhantes ao estrógeno e derivados. A união de metodologias *in silico* de alto desempenho, como modelagem tridimensional, atracamento molecular e dinâmicas moleculares atomísticas foram empregadas para a identificação de candidatos de ligação provável com a molécula de interesse. Através dessa perspectiva, foi possível prever características estruturais para a superfamília de receptores nucleares da ostra do Pacífico e selecionar candidatos de interação com o contaminante desregulador endócrino de interesse, em um organismo invertebrado não modelo. Candidatos de interação muito favorável com a molécula de interesse, dentre a superfamília de receptores nucleares de *C. gigas*, foram encontrados em nossa abordagem, pertencentes aos grupos de receptores nucleares NR1D, NR1P, NR2E e NR0B. A aplicação dessa estratégia metodológica computacional demonstrou alto desempenho na triagem virtual de candidatos à ligação com a molécula xenobiótica de interesse, podendo ser empregada em outros estudos na área da Ecotoxicologia.

**Palavras-chave:** dinâmica molecular; ecotoxicologia; modelagem 3D; bioinformática.

## ABSTRACT

The increasing presence of anthropogenic contaminants in aquatic environments poses challenges for species inhabiting contaminated sites. The nuclear receptor superfamily, due to the structural characteristics of binding to ligands that inhibit or activate gene transcription, are frequent targets of xenobiotic compounds. The present work aims to understand the potential interaction between the hormone estradiol, as an environmental contaminant, and the nuclear receptors of *Crassostrea gigas*, the Pacific oyster, a filter-feeding, sessile oyster species subject to environmental changes and exposure to contaminants. In the Pacific oyster, the nuclear receptor homologous to the vertebrate estrogen receptor is not able to bind to estradiol, as it does in vertebrates. Possibly, another receptor exhibits responsiveness to estrogen-like molecules and derivatives. The combination of high-performance *in silico* methodologies, such as three-dimensional modeling, molecular docking and atomistic molecular dynamics were employed to identify potential binding candidates with the target molecule. Through this perspective, it was possible to predict structural features for the nuclear receptor superfamily of the Pacific oyster and to select interaction candidates with the endocrine disrupting contaminant of interest in a non-model invertebrate organism. Candidates of most favorable interaction with the molecule of interest, among the *C. gigas* nuclear receptor superfamily, were found in our approach belonging to the NR1D, NR1P, NR2E and NR0B nuclear receptor groups. The application of this computational methodological strategy demonstrated high performance in the virtual screening of candidates for binding with the target xenobiotic molecule, and can be employed in other studies in the field of Ecotoxicology.

**Keywords:** molecular dynamics; ecotoxicology; 3D modeling; bioinformatics.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração esquemática da disposição dos domínios proteicos de um receptor nuclear. A região A/B, N-terminal, contém a função de ativação AF-1. O Domínio de Ligação ao DNA, (DBD), região C, inclui dois dedos de zinco. A região D, uma “dobradiça” variável, separa o domínio DBD do Domínio de Ligação ao Ligante, (LBD, região E), o qual possui o fator de ativação em hélice AF-2. A porção de tamanho variável F fica localizada na porção C-terminal. ....21
- Figura 2 - Enovelamento tridimensional típico de RNs (A) Estrutura 3D de um RN, destacando o domínio LBD e o domínio DBD, que está ligado a uma molécula de DNA. (B) Enovelamento tridimensional do domínio LBD, que possui 11-13  $\alpha$ -hélices e um grampo- $\beta$ . O sítio de ligação do domínio LBD está destacado em superfície na cor amarela.....22
- Figura 3. Mecanismos de ação de receptores nucleares. (A) Receptores de Hormônio Esteróides encontram-se no citoplasma e a partir da ligação do hormônio, ocorrem mudanças conformacionais que permitem a dissociação de complexos inibidores, ocorre a translocação até o núcleo, onde ocorre a formação de homodímeros para a ligação a elementos de resposta hormonais específicos e a transcrição de genes associados. (B) Outros receptores encontram-se no núcleo das células e são constitutivamente ligados ao DNA, geralmente formando heterodímeros com o Receptor X de Retinoide (RXR). A ligação do ligante induz altera a composição do complexo de co-repressores para co-ativadores, através de mudanças conformacionais que promovem a transcrição.....23
- Figura 4. Etapas metodológicas do estudo, dispostas de cima para baixo na ordem em que ocorreram. À esquerda da ilustração de cada etapa está indicada a metodologia utilizada e à direita da ilustração central consta(m) o(s) programa(s) utilizado(s) para realizá-las. ....35
- Figura 5. Representação tridimensional da estrutura do domínio LBD de RNs de *C.gigas* e do RE humano 1GWR. Os elementos estruturais secundários estão legendados. (A) LBD do RE humano, PDB ID 1GWR, a estrutura resolvida experimentalmente com ligação conhecida com estradiol. (B) Modelo teórico do RE da ostra do Pacífico, CgNR3A, modelo controle em nossa análise da modelagem por ser o único receptor da espécie com estrutura experimental resolvida. (C) Modelo do RN CgNR1D, de alta qualidade segundo os critérios de análise da modelagem. (D) Modelo do RN CgNR1C, desconsiderado das análises subsequentes do estudo por não apresentar a formação de importantes elementos estruturais que compõem o sítio de ligação do LBD, como as folhas- $\beta$  e H12.....38
- Figura 6. Alinhamento da estrutura experimental do RE de *C. gigas* (em azul), PDB ID 4N1Y, e do modelo CgNR3A construído por modelagem tridimensional para essa sequência da ostra do Pacífico (em verde). ....42
- Figura 7. Alinhamento da estrutura 3D do RE humano em sua conformação Apo (em roxo), conformação antagonista (em verde) e agonista (em amarelo). O retângulo em preto destaca a região onde se encontra a H12. Na conformação agonista, que corresponde à estrutura do RE humano 1GWR, a H12 encontra-se formando uma “tampa” sobre a cavidade de interação com o ligante, compactada contra H3, H5-H6 e H11, conformação conhecida como transcricionalmente favorável. Já a orientação da H12 antagonista, representada pela estrutura experimental do RE humano 3ERT, está posicionada sobre H5 e a extremidade C-terminal da H3, configuração conhecida como desfavorável ao recrutamento para transcrição. Em sua

orientação Apo, proveniente da estrutura experimental 1A52, a H12 está afastada do restante do domínio LBD. ....43

Figura 8. Classificação dos receptores nucleares em candidatos muito favoráveis, favoráveis e pouco favoráveis à ligação com estradiol, a partir dos valores de energia de ligação. Os candidatos mais favoráveis estão coloridos em verde, os favoráveis em azul e os pouco favoráveis em vermelho. As barras que representam as estruturas de controle positivo 1GWR (azul escuro) e negativo 4N1Y (vermelho escuro) estão destacadas..... 49

Figura 9. Representação da análise de decomposição dos resíduos do sítio de ligação para os candidatos muito favoráveis de interação com estradiol e a estrutura de controle positivo (1GWR). Os valores de energia para cada resíduo são ilustrados por cores e espessura, variando de resíduos que mais contribuem para a diminuição da energia livre de ligação (vermelho e mais grosso) para resíduos que menos contribuem para a diminuição da energia de ligação (azul e mais fino). Os resíduos que mais contribuem para o valor de energia de ligação negativo estão indicados para cada estrutura. (A) Estrutura experimental do RE humano, PDB ID 1GWR. (B) Modelo de CgNR1P11. (C) Modelo de CgNR0B. (D) Modelo de CgNR2E2. (E) Modelo de CgNR2E5. (F) Modelo de CgNR1P10. (G) Modelo de CgNR1D.....51

Figura 10. Gráficos da contribuição dos resíduos para a energia livre de ligação proveniente da análise de decomposição de resíduos. À direita da linha tracejada no gráfico estão os resíduos localizados em H11. (A) Decomposição de resíduos da estrutura de controle positivo, 1GWR, que possui resíduos que alcançam -1.0 kcal/mol de contribuição. Os resíduos Glu47, Arg88 e His215 do gráfico correspondem a Glu353, Arg394 e His524 do ER humano, resíduos que fazem interações polares com E2. (B) Gráfico da decomposição dos resíduos de CgNR0B, RN classificado como muito favorável à ligação com estradiol. Em nossas simulações, esse RN possui seis resíduos contribuindo para a diminuição da energia livre de ligação do complexo, com valores de contribuição que alcançam -2.35 kcal/mol..... 55

Figura 11. Gráficos da contribuição dos resíduos para a energia livre de ligação proveniente da análise de decomposição de resíduos. À direita da linha tracejada no gráfico estão os resíduos localizados em H11. (A) Decomposição de resíduos da estrutura de controle negativo, 4N1Y, contando com dois resíduos em H11 que não alcançam -0.5 kcal/mol de contribuição. (B) Contribuição dos resíduos do modelo classificado como pouco favorável à interação com estradiol CgNR1P5. Este possui apenas um resíduo em H11 e, assim como o controle negativo, não alcança -0.5 kcal/mol de contribuição..... 57

Figura 12. Ligações de hidrogênio encontradas para os complexos receptor-ligante dos candidatos muito favoráveis à ligação com estradiol CgNR1P11, CgNR0B e para a estrutura controle 1GWR. Para cada receptor, está demonstrado um gráfico da distância entre o átomo doador e aceptor de elétrons ao longo dos 100 ns de simulação e um diagrama bidimensional indicando as interações químicas entre os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação e o ligante. Linhas tracejadas pretas indicam ligações de hidrogênio, linhas sólidas verdes indicam interações hidrofóbicas e linhas tracejadas verdes indicam interações  $\pi$ - $\pi$ . Perfil de interações encontradas para 1GWR (A), CgNR1P11 (B) e CgNR2E2 (C)..... 59

Figura 13. Gráfico do Desvio Médio Quadrático (RMSD) da posição do ligante 17- $\beta$ -estradiol no sítio de ligação dos receptores nucleares candidatos muito favoráveis à ligação com esta molécula e na estrutura experimental controle 1GWR. A variação da posição do ligante na estrutura controle é mínima e é possível observar a acomodação do ligante e maior

estabilidade na posição deste nos 20 ns finais da simulação para os candidatos muito favoráveis.....	62
Figura 14. Expressão de RNs de <i>C. gigas</i> em diferentes fases do desenvolvimento. Receptores expressos durante o Desenvolvimento Embrionário estão representados em verde; na transição entre Embrião-Larva estão representados em vermelho; e na Metamorfose em roxo.....	64
Figura 15. Gráfico de Ramachandran do modelo CgNR3A demonstrando que 94.64% dos resíduos do modelo se encontram em regiões altamente preferíveis, 3.57% dos resíduos se encontram em regiões preferíveis e 1.78% dos resíduos se encontram em regiões questionáveis.....	83
Figura 16. Diagrama demonstrando a pontuação Z-score para o modelo CgNR3A, o qual demonstra pontuação de qualidade para o modelo quando este é comparado a estruturas determinadas experimentalmente.....	84
Figura 17. Gráfico de Ramachandran do modelo CgNR1D mostrando que 96.09% dos resíduos do modelo se encontram em regiões altamente preferíveis, 3.51% dos resíduos se encontram em regiões preferíveis e 0.39% dos resíduos se encontram em regiões questionáveis.....	85
Figura 18. Diagrama demonstrando a pontuação Z-score para o modelo CgNR1D o qual demonstra pontuação de qualidade para o modelo quando este é comparado a estruturas determinadas experimentalmente.....	86
Figura 19. Gráfico de Ramachandran do modelo CgNR1C demonstrando que 93.83% dos resíduos do modelo se encontram em regiões altamente preferíveis, 5.28% dos resíduos se encontram em regiões preferíveis e 0.88% dos resíduos se encontram em regiões questionáveis. Apesar de apresentar porcentagens de Ramachandran de uma estrutura proteica de alta qualidade, este modelo não apresentou todos os elementos de estrutura secundária que formam o sítio de ligação do LBD e por isso sua utilização foi descontinuada.....	87
Figura 20. Diagrama demonstrando a pontuação Z-score para o modelo CgNR1C, o qual demonstra pontuação de qualidade para o modelo quando este é comparado a estruturas determinadas experimentalmente. Apesar da pontuação de qualidade, este modelo não apresentou todos os elementos de estrutura secundária que formam o sítio de ligação do LBD e por isso sua utilização foi descontinuada.....	88
Figura 21. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR1P11.....	89
Figura 22. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR0B.....	90
Figura 23. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR2E2.....	91
Figura 24. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR2E5.....	92
Figura 25. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR1P10.....	93

Figura 26. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR1D. ....94

Figura 27. Ligações de hidrogênio encontradas para os complexos receptor-ligante dos candidatos muito favoráveis à ligação com estradiol CgNR2E2, CgNR2E5 e para a estrutura controle 1GWR. Para cada receptor, estão demonstrados um gráfico da distância entre o átomo doador e aceptor de elétrons ao longo dos 100 ns de simulação e um diagrama bidimensional indicando as interações químicas entre os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação e o ligante. Linhas tracejadas pretas indicam ligações de hidrogênio, linhas sólidas verdes indicam interações hidrofóbicas e linhas tracejadas verdes indicam interações  $\pi$ - $\pi$ . Perfil de interações encontradas para 1GWR (A), CgNR2E2 (B) e CgNR2E5 (C)..... 95

Figura 28. Ligações de hidrogênio encontradas para os complexos receptor-ligante dos candidatos muito favoráveis à ligação com estradiol CgNR1P10, CgNR1D e para a estrutura controle 1GWR. Para cada receptor, estão demonstrados um gráfico da distância entre o átomo doador e aceptor de elétrons ao longo dos 100 ns de simulação e um diagrama bidimensional indicando as interações químicas entre os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação e o ligante. Linhas tracejadas pretas indicam ligações de hidrogênio, linhas sólidas verdes indicam interações hidrofóbicas e linhas tracejadas verdes indicam interações  $\pi$ - $\pi$ . Perfil de interações encontradas para 1GWR (A), CgNR1P10 (B) e CgNR1D (C). ....97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os 43 receptores nucleares identificados no genoma da ostra do Pacífico, classificados nas subfamílias (NR0-NR5). RNs homólogos em animais modelo invertebrados e em humanos estão indicados. ....	25
Tabela 2. Parâmetros quantitativos da confiabilidade dos modelos tridimensionais dos RNs da ostra do Pacífico. ....	40
Tabela 3. Valores estimados de energia livre de ligação e interações polares encontrados nos ensaios de atracamento molecular para os RNs da ostra do Pacífico e o 17- $\beta$ -estradiol. As relações de homologia dos receptores da ostra com vertebrados e invertebrados estão destacadas para referência. ....	45
Tabela 4. Valores estimados de variação da entalpia para os complexos receptor-ligante durante os 20 nanossegundos finais das simulações de dinâmica molecular. ....	48
Tabela 5. Código de acesso do NCBI das sequências de receptores nucleares da ostra do Pacífico utilizadas no trabalho. ....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta G$	Varição da energia livre de ligação de Gibbs
$\Delta H$	Varição da entalpia
Å	Angstrom
AF-2	Função de Ativação 2
Apo	Apoproteína
BPA	Bisfenol-A
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DEQ	Desregulador Endócrino Químico
DM	Dinâmica Molecular
E2	17- $\beta$ -estradiol
EE2	17- $\alpha$ -etinilestradiol
ERR	Receptor Relacionado a Estrógeno
H	$\alpha$ -hélice
LBD	Domínio de Ligação ao Ligante
ns	Nanossegundos
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PPAR	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma
RE	Receptor de Estrógeno
RMSD	Desvio Quadrático Médio
RMSF	Flutuação Quadrática Média
RN	Receptor Nuclear
RXR	Receptor de Retinóide X
TBT	Tributilestanho
THR	Receptor de Hormônio da Tireóide
TLL	Receptor <i>Tailless</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 A OSTRA DO PACÍFICO E O CONTEXTO ECOTOXICOLÓGICO .....	17
1.2 DESREGULADORES DO FUNCIONAMENTO ENDÓCRINO EM INVERTEBRADOS COMO <i>Crassostrea gigas</i> .....	18
1.3 RECEPTORES NUCLEARES.....	20
1.4 CONTAMINANTES AMBIENTAIS COMO LIGANTES XENOBIÓTICOS.....	26
1.5 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DOS SISTEMAS BIOLÓGICOS <i>in silico</i> .....	28
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
3.1 MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DO DOMÍNIO LBD .....	31
3.2 ENSAIOS DE ATRACAMENTO MOLECULAR PROTEÍNA-LIGANTE .....	32
3.3 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR ATOMÍSTICAS .....	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
4.1 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO DOMÍNIO LBD .....	36
4.2 ATRACAMENTO MOLECULAR PROTEÍNA-LIGANTE .....	44
4.3 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR ATOMÍSTICAS .....	47
4.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PAPEL FUNCIONAL DOS CANDIDATOS MUITO FAVORÁVEIS À LIGAÇÃO COM ESTRADIOL .....	63
<b>5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE A - Código de Acesso das Sequências de RNs .....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE B - Parâmetros de Qualidade dos Modelos.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE C - Análise da Decomposição de Resíduos.....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE D - Interações Polares .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO A - Oleate Hydratase in <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LBP UFSC 2230 Catalyzes the Reversible Conversion between Linoleic Acid and Ricinoleic Acid. .99</b>	

**ANEXO B - Emergence of two distinct SARS-CoV-2 Gamma variants and the rapid spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the second wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil. ....100**

**ANEXO C - Participação na Dissertação de mestrado: Identificação de grupos de genes ortólogos em modelos vertebrados e invertebrados: características e análises comparativas.....101**



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A OSTRAS DO PACÍFICO E O CONTEXTO ECOTOXICOLÓGICO

O gênero *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) engloba espécies de ostras com distribuição global em ambientes tropicais e temperados. A espécie *Crassostrea gigas*, a ostra do Pacífico, é nativa do nordeste asiático (SHELMERDINE; MOUAT; SHUCKSMITH, 2017) e ocorre naturalmente em regiões entre-marés e estuarinas. É a espécie de ostra mais cultivada no Brasil, com destaque para o estado de Santa Catarina, devido às condições geográficas favoráveis (IGARASHI, 2018). As regiões habitadas pela espécie e nas quais se realiza seu cultivo, estão próximas de grande densidade populacional humana, recebendo cargas elevadas de contaminantes de origem antrópica (MORAES et. al., 2001). *C. gigas* é um invertebrado sésil, que se fixa ao substrato, permanecendo no mesmo local ao longo de sua vida e se alimenta através da filtração da água circundante. Devido a estas características, a ostra está exposta a diversos patógenos e substâncias possivelmente tóxicas, como xenobióticos (COLLIN et. al., 2010). Ao longo da evolução biológica, as ostras desenvolveram vários mecanismos de adaptação ao estresse ambiental, como a duplicação gênica envolvendo processos de biotransformação e resposta a estresse ambiental (ZHANG et. al., 2016). A espécie também é conhecida por bioacumular, tolerar poluentes e possuir sensibilidade a alterações de seu *habitat*, como ao fenômeno de acidificação dos oceanos, em que este organismo apresenta alterações em vias metabólicas, como as de respostas a antioxidantes, metabolismo de carboidratos, transcrição e tradução (TIMMINS-SCHIFFMAN et al., 2014).

As características ecológicas de *C. gigas*, sua ampla distribuição global, plasticidade na manutenção da sobrevivência em locais contaminados e bioacumulação de produtos químicos por filtração a tornam uma espécie ideal para o monitoramento de áreas poluídas (VOGELER et. al., 2014). As ostras representam um percentual significativo dos animais utilizados como sentinela em biomonitoramento ambiental, fornecendo dados sobre os efeitos biológicos provocados por contaminantes através de biomarcadores de contaminação aquática (ZACCHI, 2013). A rápida resposta à presença de contaminantes e a capacidade de bioacumulá-los evidencia a configuração de ostras e moluscos bivalves em geral, como animais modelo para estudos ecotoxicológicos (COLLIN et. al., 2010; SOLÉ et. al., 2007; ZHANG et. al., 2016). Exemplos de biomarcadores conhecidos e utilizados para avaliar a presença de contaminantes incluem enzimas de defesa antioxidante, como

Glutathione-S-transferase, enzimas de biotransformação, como Citocromo P450 e danos ao DNA (NICHOLSON & LAM, 2005; ZHANG et. al., 2016). Dessa forma, o monitoramento através de organismos, como *C. gigas*, é capaz de fornecer alertas sobre as condições de áreas contaminadas, permitindo o planejamento de estratégias para contornar situações de estresse ambiental (CAJARAVILLE et al., 2000).

## 1.2 DESREGULADORES DO FUNCIONAMENTO ENDÓCRINO EM INVERTEBRADOS COMO *Crassostrea gigas*.

O sistema endócrino de animais compreende moléculas mensageiras químicas que são secretadas para coordenar vários mecanismos e processos fisiológicos de um organismo (NELSON; COX, 2014). Este complexo sistema permite que o organismo reaja coordenadamente a inúmeros estímulos externos (ambientais) e internos (fisiológicos) (KETATA et. al., 2008). Diversos aspectos do funcionamento endócrino de moluscos, como os bivalves, são pouco conhecidos (VOGELER et. al., 2014; FORD & LEBLANC; 2020). Em termos evolutivos, acredita-se que as glândulas endócrinas apareceram primeiro em moluscos, porém células endócrinas já ocorriam em anelídeos (LAFONT, 2000). O sistema endócrino de moluscos e especialmente o eixo reprodutivo, geralmente inclui apenas células neurosecretoras e outras glândulas endócrinas, como as gônadas (KETATA et. al., 2008). *C. gigas* é uma espécie hermafrodita sequencial, em que se observa a mudança de sexo nos dois sentidos, diversas vezes nos ciclos reprodutivos dos indivíduos. As gônadas nessa espécie são um tecido difuso e não permanente, composto de células somáticas e células germinativas que envolvem a glândula digestiva (GOSLING., 2004). A reprodução é induzida principalmente pela temperatura e disponibilidade de alimentos. Há pouca informação sobre as influências genéticas e fenotípicas da diferenciação sexual em ostras, e sobre as vias moleculares que regulam a reprodução (DHEILLY et. al., 2012).

Hormônios que desempenham papéis centrais de modulação e regulação em vertebrados, como os esteróides, não possuem vias de síntese endógenas estabelecidas para muitos invertebrados (SCOTT, 2018), para os quais não há volume de estudos demonstrando que esses animais possuem todas as enzimas necessárias para a produção endógena de esteróides (FODOR et. al., 2020). Certamente, a falta de origem endógena não inviabiliza uma função biológica para estas moléculas (o próprio ser humano depende da ingestão de moléculas em sua dieta, como a vitamina D) (LAFONT, 2000). Por outro lado, a ausência de produção endógena pode suscitar dúvidas sobre uma função conservada no funcionamento e

regulação endócrina (FODOR et. al., 2020). De fato, diversos estudos demonstraram a presença de esteróides em tecidos de moluscos (JANER; PORTE, 2007; SCOTT, 2012; 2018), levantando possíveis efeitos fisiológicos desses hormônios nestes organismos.

Desreguladores Endócrinos Químicos (DEQs) são um grupo de moléculas contaminantes com notoriedade devido ao seu impacto no meio ambiente e na saúde de animais humanos e não humanos (KETATA et. al., 2008). Estes são compostos, naturais ou sintéticos, que apresentam o potencial de alterar o funcionamento hormonal e homeostático dos organismos, através da exposição natural ou em regiões poluídas, afetando mecanismos de comunicação e resposta com o ambiente. Como exemplos de DEQs podemos citar a molécula Bisfenol-A (BPA), encontrada no plástico e o pesticida Diclorodifeniltricloroetano (DDT) (DIAMANTI-KANDARAKIS et. al., 2009). Hormônios naturais, como 17- $\beta$ -estradiol (E2) e estrógenos sintéticos, como 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), também são classificados como DEQs e apresentam elevado potencial de desregulação. E2 e EE2 foram incluídos na lista de poluentes aquáticos da União Europeia (BARREIROS et al., 2016) e os riscos para organismos aquáticos podem incluir a síntese e secreção de vitelogenina em peixes machos, desenvolvimento de características intersexuais e falha no desenvolvimento de características reprodutivas secundárias típicas (SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012). E2 e EE2 já foram detectados contaminando regiões estuarinas e marinhas, locais de ocorrência natural da ostra do Pacífico e também local onde a espécie é cultivada (BARREIROS et al., 2016). O contato de moluscos com hormônios esteróides pode ocorrer em áreas contaminadas, onde são encontrados esteróides tanto de origem sintética, quanto provenientes do metabolismo de animais vertebrados (SCOTT, 2012). Apesar das diferenças em vias metabólicas e na composição do sistema endócrino comparado aos vertebrados, os invertebrados apresentam sensibilidade à exposição à DEQs, em particular durante o seu desenvolvimento embrionário (MIGLIOLI et. al., 2021).

Um exemplo clássico de desregulação endócrina em invertebrados envolve o composto tributilestanho (TBT), uma substância extensamente utilizada como anti-incrustante na pintura de navios e redes de pesca desde o início dos anos 60 até 2005, quando teve sua utilização proibida, devido à sua toxicidade ao entrar em contato com diversas espécies marinhas, como moluscos (FORD & LEBLANC; 2020; VOGELER et. al., 2014). A exposição de moluscos ao TBT ocasiona o fenômeno chamado imposex, caracterizado pela sobreposição de características sexuais de machos em fêmeas, como o surgimento de vaso deferente e pênis (MIGLIOLI et. al., 2021). Esse fenômeno impacta negativamente as populações afetadas, podendo ocasionar a esterilização das fêmeas e declínio populacional.

Além disso, esta molécula é bioacumulada por diversos organismos (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). O imposex vem sendo utilizado como marcador biológico para identificar a contaminação de áreas poluídas por butilestânicos e ressalta a importância da utilização de biomarcadores para monitoramento de regiões poluídas (ROSSATO, 2017). Em moluscos bivalves, como *C. gigas*, a exposição a organoestânicos, como o TBT, induz o espessamento da concha, a redução do crescimento, a interrupção do desenvolvimento e uma alta taxa de mortalidade em ostras (HIGUERA-RUIZ & ELORZA, 2009; 2011; HUANG et al., 2020). Sabe-se que o TBT é capaz de interagir com receptores nucleares (RNs) de vertebrados (BAKER et al., 2015), no entanto, o mecanismo pelo qual o TBT afeta as espécies de moluscos permanece incerto. Hipóteses relacionadas à ligação do TBT ao receptor nuclear RXR (Receptor X de Retinoide) ou ao heterodímero RXR/PPAR (Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma) de moluscos foram levantadas nos estudos de Vogeler e colaboradores (2017) e de Huang e colaboradores (2020). Esses achados indicam que os efeitos tóxicos de xenobióticos podem ser mediados pela desregulação de receptores nucleares em *C. gigas*. As características da superfamília de proteínas dos RNs e as implicações fisiológicas de sua ligação com xenobióticos serão discutidas adiante.

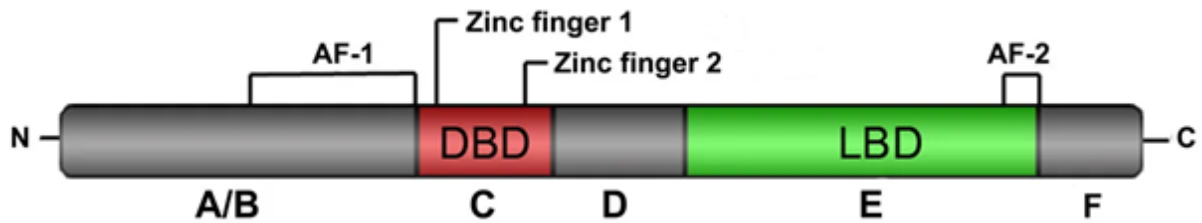
Ao contrário da conhecida toxicidade do TBT para diversas espécies, o número de contaminantes cuja atividade é desconhecida e que não possuem normativas de regulamentação ambiental é crescente. Essa classe de poluentes é denominada de contaminantes emergentes (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011). Substâncias como fármacos, agrotóxicos, derivados do petróleo e da indústria de cosméticos são exemplos de contaminantes emergentes. O estudo dos mecanismos de interação das biomoléculas com essas substâncias possibilita caracterizar novos biomarcadores da presença de poluentes, contribuindo para o entendimento dos fenômenos fisiológicos e ecológicos decorrentes destas exposições.

### 1.3 RECEPTORES NUCLEARES

Receptores nucleares são proteínas exclusivas de animais (HUANG et al., 2015), pertencentes à superfamília de fatores de transcrição. Dessa forma, atuam através da modulação da transcrição de genes alvo, participando da regulação de importantes vias, como no controle do metabolismo, do desenvolvimento e da reprodução (BRIDGHAM et al., 2014). Os RNs possuem estrutura proteica característica, que consiste nos domínios A/B, C, D, E e F, ilustrados na Figura 1. Os domínios A/B constituem a região N-terminal do RN e contém a

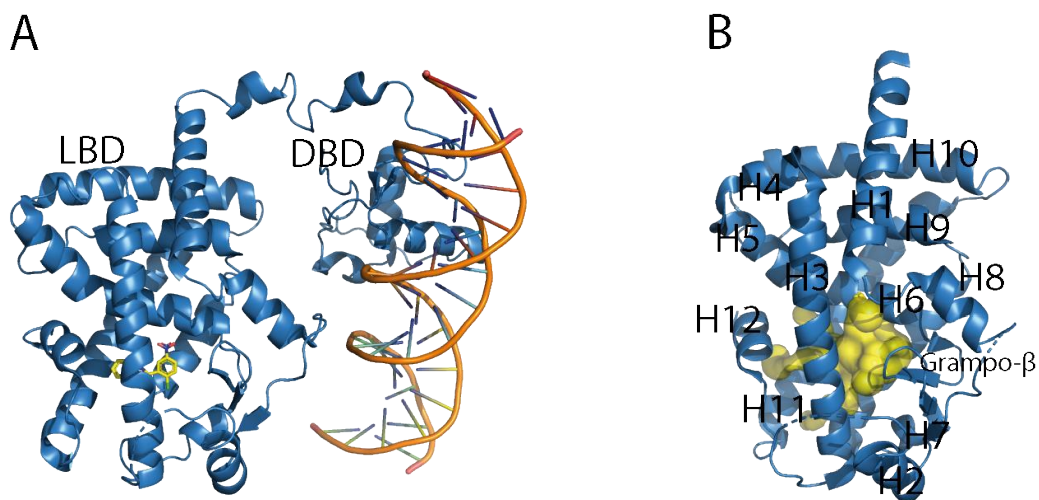
função de ativação AF-1, capaz de cooperar com a função de ativação AF-2 (hélice 12), no domínio E, para propósitos de regulação da transcrição. A região C corresponde ao Domínio de Ligação ao DNA (DBD), sigla do inglês *DNA-Binding Domain*, porção que interage diretamente com o DNA e o mais conservado domínio dos RNs. Essa região possui dois “dedos” de zinco, que correspondem a  $\alpha$ -hélices com funções relacionadas à dimerização do receptor e determinar a especificidade da interação com o DNA (VOGELER et. al., 2014). Os RNs se ligam ao DNA nos chamados elementos de resposta, que são sequências específicas localizadas nas regiões reguladoras dos genes-alvo (MIGLIOLI et. al., 2021). O domínio D corresponde a uma “dobradiça” flexível, que conecta o domínio DBD ao domínio E, o segundo domínio mais conservado, chamado de Domínio de Ligação ao Ligante (LBD), sigla do inglês *Ligand-Binding Domain*. Muitos RNs são ativados a exercer sua função na modulação transcricional a partir da ligação de uma molécula, um ligante, no sítio de ligação do domínio LBD. Por fim, o domínio F configura a região C-terminal, que varia de tamanho e conecta o RN ao seu par quando ocorre a dimerização (FODOR et. al., 2020). A Figura 2A demonstra o enovelamento terciário típico de um RN, com a presença de uma molécula de DNA. Segundo o Comitê para Nomenclatura dos Receptores Nucleares (1999), os RNs são categorizados em seis diferentes subfamílias, NR1-NR6, através de análises filogenéticas e agrupamento por similaridade entre os dois domínios mais conservados, DBD e LBD. Os receptores que diferem dessa organização estrutural, que contêm apenas um dos dois domínios conservados (C ou E) são classificados na subfamília 0 (NR0), independentemente de sua origem evolutiva. Dentro de cada subfamília, ocorrem diferentes grupos de RNs. Membros do mesmo grupo em geral compartilham pelo menos 80–90% de identidade no DBD e pelo menos 40–60% de identidade no LBD. Os diferentes grupos em cada subfamília são indicados por letras maiúsculas. Por exemplo, a subfamília NR3 possui três grupos: NR3A, NR3B e NR3C (NRNC, 1999).

Figura 1 - Ilustração esquemática da disposição dos domínios proteicos de um receptor nuclear. A região A/B, N-terminal, contém a função de ativação AF-1. O Domínio de Ligação ao DNA, (DBD), região C, inclui dois dedos de zinco. A região D, uma “dobradiça” variável, separa o domínio DBD do Domínio de Ligação ao Ligante, (LBD, região E), o qual possui o fator de ativação em hélice AF-2. A porção de tamanho variável F fica localizada na porção C-terminal.



Fonte: Adaptada de Vogeler e colaboradores (2014).

Figura 2 - Enovelamento tridimensional típico de RNs (A) Estrutura 3D de um RN, destacando o domínio LBD e o domínio DBD, que está ligado a uma molécula de DNA. (B) Enovelamento tridimensional do domínio LBD, que possui 11-13  $\alpha$ -hélices e um grampo- $\beta$ . O sítio de ligação do domínio LBD está destacado em superfície na cor amarela.

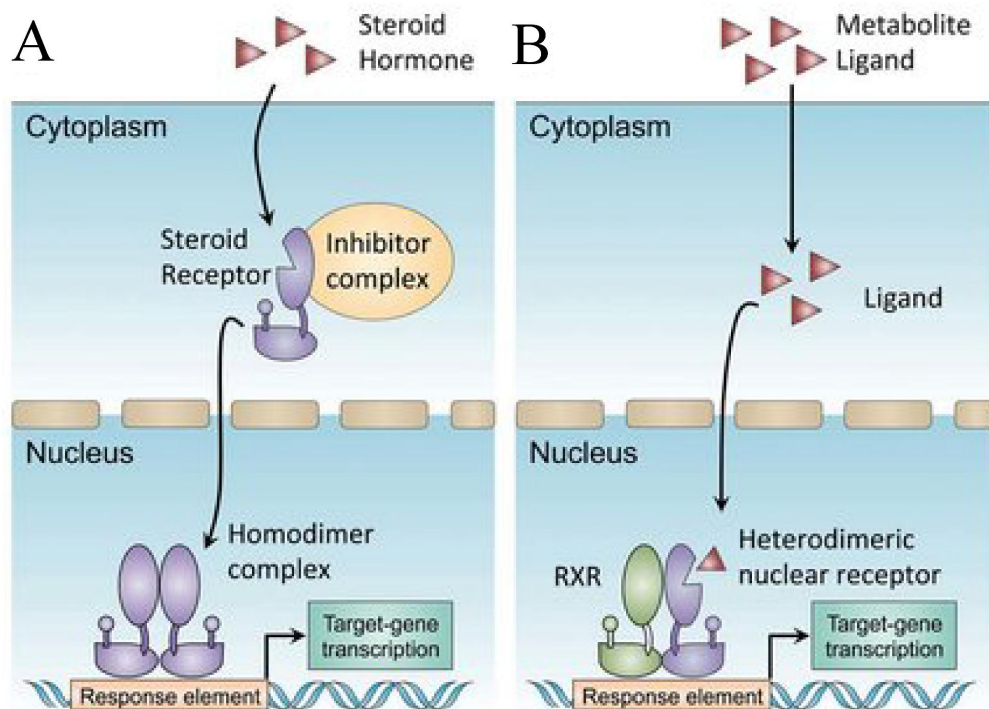


Fonte: Elaborada pela autora no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019). PDB ID A: 3E00. PDB ID B: 2ZNP.

Os mecanismos de ativação transcricional de RNs variam conforme o receptor. Há RNs, como os de hormônios esteróides, como o Receptor de Estrógeno (RE), que se encontram no citoplasma e a partir da ligação com seu hormônio específico, se translocam para o núcleo, onde funcionam como homodímeros para regular a transcrição de genes-alvo (Figura 3A) (KING-JONES; THUMMEL, 2005). Em contraste, outros RNs encontram-se no núcleo, permanentemente associados ao DNA, formando heterodímeros com o RXR e agindo como repressores transcricionais (MANGELSDORF & EVANS, 1995). Ao se ligarem aos hormônios, ocorre a associação de complexos co-ativadores, que irão promover a transcrição do gene alvo (Figura 3B) (AVIOR et. al., 2013; JOHANSSON et. al., 1999). A adição de

pequenos ligantes, portanto, altera o estado funcional dessa superfamília de proteínas (TAO et. al., 2020). Os receptores nucleares hormonais, por exemplo, possuem sua atividade controlada pela ligação à pequenas moléculas, como ligantes endógenos, hormônios e vitaminas da dieta (LI; LAMBERT; XU, 2003; TAO et. al., 2020). Nem todos os RNs possuem um ligante natural conhecido, e, devido a isso, estes receptores são chamados de receptores órfãos. Nesse grupo de receptores há membros que são constitutivamente ativados, ou seja, modulam a transcrição independente da presença de ligantes (KING-JONES; THUMMEL, 2005).

Figura 3. Mecanismos de ação de receptores nucleares. (A) Receptores de Hormônio Esteróides encontram-se no citoplasma e a partir da ligação do hormônio, ocorrem mudanças conformacionais que permitem a dissociação de complexos inibidores, ocorre a translocação até o núcleo, onde ocorre a formação de homodímeros para a ligação a elementos de resposta hormonais específicos e a transcrição de genes associados. (B) Outros receptores encontram-se no núcleo das células e são constitutivamente ligados ao DNA, geralmente formando heterodímeros com o Receptor X de Retinoide (RXR). A ligação do ligante induz altera a composição do complexo de co-repressores para co-ativadores, através de mudanças conformacionais que promovem a transcrição.



Fonte: Adaptada de Avior, Bomze, Ramon e Nahmias (2013).

O sítio de ligação do domínio LBD, destacado na forma de superfície amarela na Figura 2B, é suscetível à ligação de moléculas exógenas, como xenobióticos. Estes xenobióticos podem induzir ou inibir a expressão de genes, por mimetizar a interação do receptor com seu ligante natural (OMIECINSKI et al., 2010). As consequências para o organismo podem incluir expressão anormal de genes e a desregulação do desenvolvimento e funcionamento endócrino (VOGELER et al., 2014). RNs como o PPAR (BAKER et al., 2015) e RE (PARK et al., 2020; GOULD et al., 1998) apresentam ligação e respostas decorrentes da interação com os xenobióticos TBT e BPA, respectivamente. O RE humano, assim como PPAR, possui um sítio de ligação para ligantes no seu domínio LBD considerado “promíscuo”, ou seja, um sítio de ligação volumoso, que possibilita a ligação de diferentes ligantes (BRZOZOWSKI et al., 1997; EICK et al., 2012; BAKER, 2019). Essa condição “promíscua” do sítio de ligação é favorável ao desenho de fármacos (LI; LAMBERT; XU, 2003), interessante do ponto de vista clínico, entretanto, pode tornar RNs mais suscetíveis à ligação com xenobióticos, como contaminantes ambientais.

As reconstruções mais parcimoniosas de estudos filogenéticos da superfamília de RNs indicam que o receptor ancestral comum à toda superfamília provavelmente foi um receptor ativado por ligante, possivelmente por ácidos graxos (BRIDGHAM et al., 2010). No curso da evolução dos animais, os RNs experienciaram um padrão complexo de expansão gênica, incluindo a duplicação, a divergência, a perda de alguns genes e o aumento considerável no número de RNs, o que levou à atual diversidade destas proteínas em metazoários (MIGLIOLI et al., 2021). Acredita-se que essas proteínas se diversificaram a partir de um único RN de um metazoário ancestral, uma vez que foram identificados dois RNs em *Amphimedon queenslandica*, do filo Porifera (BRIDGHAM et al., 2010), ocorrendo uma expansão em outros animais: 17 no cnidário *Nematostella vectensis* (REITZEL; TARRANT, 2009), 18 em *Drosophila melanogaster* (KING-JONES; THUMMEL, 2005), 43 em *Crassostrea gigas* (VOGELER et al., 2014), 270 em *Caenorhabditis elegans* (SLUDER; MAINA, 2001) e 48 RNs em humanos (LI; LAMBERT; XU, 2003). A Tabela 1 apresenta os 43 RNs de *C. gigas* e seus homólogos em humanos e em animais modelo invertebrados. Os RNs da ostra são categorizados em seis subfamílias (NR0-NR5). A ostra do Pacífico possui a maioria de seus RNs agrupados em subfamílias através de análises filogenéticas (subfamílias NR1-NR5). A espécie também possui um representante na subfamília NR0, que compreende RNs anormalmente estruturados, os quais não possuem um dos domínios conservados (DBD ou LBD) e também em um grupo contendo DBDs em tandem e um único LBD, categorizados como grupo 2DBDNR (VOGELER et al., 2014)



Tabela 1. Os 43 receptores nucleares identificados no genoma da ostra do Pacífico, classificados nas subfamílias (NR0-NR5). RNs homólogos em animais modelo invertebrados e em humanos estão indicados.

<b>Subfamília e Grupo do RN</b>	<i>C. gigas</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>
1A	CgNR1A	THR		
1B	CgNR1B	RAR		
1C	CgNR1C	PPAR		
1D	CgNR1D	Rev-Erb	E75	NHR85
	CgNR1CDEFa CgNR1CDEFb			
1E	CgNR1E		E78	
1F	CgNR1F	ROR	DHR3	NHR23
1H	CgNR1H	LXR, FXR	EcR	
1J	CgNR1Ja		DHR96	DAF12, NHR8
	CgNR1Jb			NHR8
	CgNR1Jg			
1P	CgNR1P1			
	CgNR1P2			
	CgNR1P3			
	CgNR1P4			
	CgNR1P5			
	CgNR1P6			
	CgNR1P7			
	CgNR1P8			
	CgNR1P9			
	CgNR1P10			
	CgNR1P11			
2A	CgNR2A	HNF4		NHR64, NHR69
2B	CgNR2B	RXR	USP	
2C	CgNR2CD	TR		
2E	CgNR2E1	TLX		FAX1
	CgNR2E2		TLL, DSF	
	CgNR2E3	PNR	DHR51	
	CgNR2E5		HR83	
2F	CgNR2F	COUP-TF, EAR2	SVP	UNC55
3A	CgNR3A	RE		

3B	CgNR3B	ERR	DERR	
4A	CgNR4A	NGFIB, NURR1, NOR1	DHR38	NHR6
5A	CgNR5A	SF1, LRH	FTZ-F1	NHR25
5B	CgNR5B		DHR39	
0B	CgNR0B	DAX1, SHP		
2DBDNR	Cg2DBD $\gamma$			
	Cg2DBD $\delta$			
Apenas DBD	CgNHR40			
	CgNHR41			
Não atribuído	CgNHR42			
	CgNHR43			

Fonte: Adaptada de Vogeler e colaboradores (2014). As diferentes isoformas dos RNs homólogos não estão indicadas, apenas a homologia a cada grupo.

#### 1.4 CONTAMINANTES AMBIENTAIS COMO LIGANTES XENOBIÓTICOS.

Contaminantes ambientais são continuamente reportados em diversos compartimentos ambientais (HERNANDO *et. al.*, 2006), como ambientes aquáticos, em que estes são provenientes principalmente de esgotos domésticos e industriais. Em muitos casos, essas moléculas não são eliminadas em processos de tratamento de água, nem possuem regulamentação sanitária (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011). Essa classe de poluentes já citada, os contaminantes emergentes, possuem representantes como a cafeína (psicoativo estimulante), o ibuprofeno (anti-inflamatório), a carbamazepina (anticonvulsivo), a novobiocina (antibiótico) e o tamoxifeno (quimioterapêutico), moléculas extensamente utilizadas por humanos, encontradas em esgotos sanitários e ambientes aquáticos. Estudos demonstraram que, em contato com essas substâncias, invertebrados apresentaram respostas de estresse evidenciadas através de biomarcadores, como enzimas de biotransformação e de resposta a estresse oxidativo (AGUIRRE-MARTÍNEZ; DELVALLS; MARTÍN-DÍAZ, 2015).

Hormônios lipofílicos se difundem com facilidade pelos tecidos dos organismos através de suas membranas, dessa forma sendo ideais para controlar a expressão gênica em diferentes tecidos e, conseqüentemente, regular o crescimento, diferenciação e metabolismo (MANGELSDORF *et al.*, 1995). Exemplos endógenos desses hormônios são os retinóides, esteróides e hormônios da tireóide (BAKER, 2019). A presença de estrogênios, como 17- $\beta$ -estradiol, no ambiente é um problema devido aos possíveis efeitos negativos sobre os organismos, mesmo em concentrações baixas de nanograma/litro (COMBALBERT;

HERNANDEZ-RAQUET, 2010). E2 e o estrogênio sintético EE2 foram identificados como principais fontes de atividade estrogênica no meio ambiente (BARREIROS et. al., 2016). Os hormônios esteróides, portanto, pertencem à classe de contaminantes emergentes que demandam estudos para a compreensão de seu espectro de ação nos mais diversos organismos.

A contribuição evolutiva de receptores esteróides em vertebrados é marcante, a qual proporcionou melhor regulação de diversas vias fisiológicas de diferenciação, desenvolvimento, reprodução e resposta ao estresse (BAKER, 2019). Invertebrados possuem homólogos de receptores esteróides de vertebrados, porém seus mecanismos de interação com moléculas esteróides permanecem incertos (SCOTT, 2013), demandando estudos que esclareçam possíveis interações e relações evolutivas envolvendo esses receptores e seus ligantes. O domínio LBD do RE de vários moluscos, como a lesma do mar *Aplysia californica* (THORNTON; NEED; CREWS, 2003) o cefalópode *Octopus vulgaris* (KEAY; BRIDGHAM; THORNTON, 2006) o caracol do mar *Thais clavigera* (KAJIWARA et. al., 2006), e a ostra *Crassostrea gigas* (MATSUMOTO et. al., 2007), ativa a transcrição em altos níveis na ausência de ligantes, segundo dados experimentais. Nenhum aumento na ativação da transcrição foi observado quando estes receptores são tratados com hormônios esteróides (BRIDGHAM et. al., 2014). Dessa forma, o RE de diversos moluscos, como *C. gigas*, modula a transcrição independentemente da presença de hormônios esteróides, ou seja, são constitutivamente ativados (KEAY & THORNTON, 2009). Através da resolução experimental da estrutura do LBD do RE de *C. gigas*, Bridgham e colaboradores (2014) identificaram uma incompatibilidade estrutural da ligação do hormônio estradiol nesse receptor, pois ao contrário do que ocorre para vertebrados, o volume do sítio de ligação do RE da ostra é reduzido para comportar este ligante. Por outro lado, hormônios esteróides podem estar envolvidos em vias de sinalização e regulação da transcrição através da interação com outros receptores e constituintes celulares, que não os REs. A repercussão da interação de moléculas esteróides com espécies de animais invertebrados está sendo caracterizada, mobilizando estudos para seu entendimento e permitindo contribuições de diferentes abordagens, como as metodologias *in silico*.

Dados experimentais demonstraram que os REs de anelídeos, filo irmão dos moluscos, podem se ligar e ativar a transcrição em resposta a E2 e desreguladores endócrinos (KEAY & THORNTON, 2009). Além disso, a ostra do Pacífico possui três homólogos do receptor NR1J, que responde a hormônios esteróides no invertebrado *Daphnia pulex* (KARIMULLINA et al., 2012), um caso de ligante esteróide modulando receptores nucleares

que não os de hormônios sexuais. Diante do exposto, em nossa perspectiva o ligante E2 foi entendido como um contaminante ambiental, que entra em contato com os tecidos de *C. gigas* e têm a potencialidade de interação e modulação de membros da superfamília de RNs da espécie.

### 1.5 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DOS SISTEMAS BIOLÓGICOS *in silico*.

A representação e simulação *in silico* dos sistemas biológicos é uma área da biologia que cresce e possui novas tecnologias sendo desenvolvidas, validadas e amplamente utilizadas na atualidade (HADDAD; ADAM; HEGER, 2020; SOUZA et. al., 2021). A predição da estrutura tridimensional de proteínas, por exemplo, possui aplicabilidades como predição de sítios ativos, identificação de padrões de enovelamento e engenharia de proteínas (VERLI, 2014). Para espécies de animais invertebrados, como *C. gigas*, as informações estruturais de proteínas são escassas e muitas inferências sobre sua estrutura e função são feitas a partir do que se conhece para animais vertebrados (FODOR et. al., 2020).

A ostra do Pacífico possui 43 RNs identificados em seu genoma (VOGELER et. al., 2014), entretanto para apenas um deles está disponível uma estrutura experimental resolvida, é o caso do RE da espécie (BRIDGHAM et. al., 2014). Dessa forma, há uma lacuna crescente entre o número de sequências e estruturas 3D de proteínas depositadas em bancos de dados. Uma estimativa recente demonstrou que o número de sequências descobertas é 736 vezes maior do que o número de estruturas 3D resolvidas experimentalmente (MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2018). Bienalmente, ocorre o encontro CASP (*Critical Assessment of protein Structure Prediction* - <https://predictioncenter.org/>), no qual estruturas recentemente resolvidas experimentalmente que ainda não foram divulgadas publicamente são modeladas por várias metodologias, de modo que seja um teste cego para os métodos participantes. O encontro ocorre desde 1994 como a avaliação mais precisa para previsão da estrutura de proteínas (HADDAD; ADAM; HEGER, 2020). O grupo Yang Zhang já venceu a competição CASP por vários anos e é o grupo responsável por desenvolver a metodologia de modelagem teórica de proteínas que utilizamos em nossa abordagem, o I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) (CROLL et. al., 2019). O método de predição do enovelamento ou *threading*, utilizado pelo I-TASSER, parte do pressuposto de que a estrutura tridimensional é mais conservada que a sequência e, portanto, mesmo sequências pouco similares podem assumir a mesma estrutura, limitando o número de enovelamentos que proteínas podem assumir (VERLI, 2014). Devido às boas avaliações deste programa e, portanto, sua aceitação

na comunidade científica e também devido a testes que realizamos para encontrar uma metodologia de modelagem que fosse capaz de fornecer modelos de qualidade no contexto de uma espécie de invertebrado não-modelo, o pacote I-TASSER foi selecionado (ZHANG, 2008).

A caracterização da estrutura de proteínas possibilita o estudo da interação proteína-ligante, primordial para diversas funções celulares, como transdução de sinal, regulação da transcrição e catálise, além de ser crucial para o desenvolvimento de importantes áreas e aplicações, como a produção de novos fármacos e busca por alvos moleculares (DOSS et. al., 2014; GANESAN; COOTE; BARAKAT, 2017; SOUZA et. al., 2020). Neste sentido, técnicas computacionais como o atracamento molecular (*molecular docking*, em inglês) auxiliam através da previsão do modo de ligação e dos detalhes do reconhecimento molecular receptor-ligante (VERLI, 2014). Simulações de Dinâmica Molecular (DM) atomísticas, em que todos os átomos de um sistema de simulação são representados explicitamente, são muito utilizadas em conjunto ao *docking* molecular (OKIMOTO et. al., 2009). DMs possibilitam a obtenção de modelos de biomoléculas mais próximos da realidade biológica, pois incluem diretamente características como a flexibilidade molecular, a temperatura e a presença de um solvente, através de campos de força que realizam cálculos de mecânica clássica para prever a trajetória dos átomos (VERLI, 2014). As metodologias computacionais citadas, utilizadas de maneira combinada em nossa proposta, buscam tornar mais fidedigna possível a descrição de processos biológicos e assumem cada vez mais papel de destaque em pesquisas associadas à saúde e à biotecnologia (DOSS et. al., 2014). Buscamos, através de nossa abordagem, utilizar estas metodologias para estudo na área de toxicologia ambiental, de forma que informações novas sobre a estrutura e função da superfamília de RNs de uma espécie modelo para estudos de ecotoxicologia possam ser indicadas, auxiliando na construção do conhecimento biológico sobre a espécie e impulsionando estudos posteriores na área.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar estruturalmente o domínio LBD da superfamília de receptores nucleares de *C. gigas* e mapear potenciais alvos de ligação com o xenobiótico 17- $\beta$ -estradiol.

### 2.1.2 Objetivos Específicos

- I. Realizar modelagem tridimensional do Domínio de Ligação ao Ligante da superfamília de receptores nucleares de *C. gigas*;
- II. Selecionar RNs da ostra do Pacífico com modos de ligação possíveis com a molécula 17- $\beta$ -estradiol, através de atracamento molecular;
- III. Avaliar a estabilidade do complexo receptor-ligante, as energias de ligação e interações proteína-ligante, via dinâmica molecular de alvos de interação com 17- $\beta$ -estradiol.
- IV. Mapear candidatos com maior grau de afinidade com a molécula xenobiótica 17- $\beta$ -estradiol através de triagem virtual *in silico*.
- V. Analisar funcionalmente os níveis de expressão dos RNs alvos mais favoráveis de ligação ao 17- $\beta$ -estradiol, em diferentes fases do desenvolvimento de *C. gigas*.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DO DOMÍNIO LBD

A obtenção de estruturas tridimensionais do domínio LBD da superfamília de RNs da ostra do Pacífico foi realizada a partir das sequências dos RNs disponíveis no genoma da espécie depositado no NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*). Realizamos alinhamentos das sequências de RNs de *C. gigas* utilizadas por Vogeler e colaboradores (2014), que construiu a árvore filogenética e realizou a nomenclatura dos RNs dessa espécie, e dessa forma, foi utilizada como base em nosso trabalho, contra todas as sequências disponíveis no NCBI. Os alinhamentos foram feitos no BLAST (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) (CAMACHO et al., 2009) e tiveram como objetivo a seleção das sequências de cada RN que mais se assemelham às classificadas pelo artigo de referência citado. Alinhamentos no BLAST utilizando como referência o PDB (do inglês *Protein Data Bank*) e no programa Clustal Omega (SIEVERS et. al., 2011) também foram realizados a fim de localizar o domínio LBD e verificar a similaridade entre a sequência dos receptores de *C. gigas* e as sequências depositadas em bancos de dados. Sequências da versão antiga do genoma da ostra do Pacífico (ZHANG et. al., 2012) e sequências do genoma atualizadas (WANG et. al., 2020) foram selecionadas, pois sequências de ambas as versões possuem alta identidade entre si (mais de 95%) e possuem alta identidade quando alinhadas às sequências utilizadas por Vogeler e colaboradores (2014). Na Tabela 5 do APÊNDICE A consta o código de acesso de cada sequência de RN utilizada em nosso trabalho. O pacote I-TASSER (ZHANG, 2008) foi empregado para a técnica de modelagem. Este programa divide a sequência de entrada em fragmentos, faz alinhamentos com diversas estruturas experimentais como referência, se baseando na sequência de aminoácidos e em recursos estruturais, para realizar a predição do enovelamento para a sequência de interesse. A topologia dos modelos é construída remontando os fragmentos obtidos do alinhamento com estruturas utilizadas como moldes. Várias etapas de simulação da topologia são feitas para refinamento da estrutura até a formação final do modelo (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010). Análises da confiabilidade e precisão global dos modelos gerados foram realizadas utilizando os critérios *C-score* (pontuação de qualidade calculada pelo próprio I-TASSER); gráfico de Ramachandran (ANDERSON et. al., 2005), para avaliar os ângulos e torções permitidos para estruturas de proteínas; a pontuação *Z-score*, baseada em comparações dos modelos gerados com estruturas experimentais, pelo programa de avaliação de qualidade de modelos ProSA-web

(WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007); e verificação individual do enovelamento de cada modelo nos programas PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019) e UCSF Chimera (PETTERSEN, 2004), comparando com a predição de estrutura secundária para a sequência gerada pelo programa PSIPRED (JONES, 1999).

### 3.2 ENSAIOS DE ATRACAMENTO MOLECULAR PROTEÍNA-LIGANTE

Os testes de atracamento molecular foram realizados utilizando o programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010). O atracamento, ou *docking* molecular, é um experimento computacional que busca prever a ligação não covalente de uma macromolécula (receptor) com uma pequena molécula (ligante), começando com suas estruturas não ligadas, como as provenientes de modelagem. O objetivo é caracterizar possíveis orientações em que ocorre ligação e as suas respectivas afinidades (TROTT; OLSON, 2010). Os modelos avaliados com boa qualidade na etapa de modelagem foram utilizados nos ensaios de atracamento molecular. Além dos modelos, uma estrutura experimental controle positiva, o RE humano (PDB ID 1GWR), foi utilizado como controle positivo por apresentar ligação bem descrita com a molécula alvo, o hormônio estradiol. Uma estrutura controle experimental negativa (PDB ID 4N1Y) também foi incluída na análise, pois é a única estrutura experimental de LBD de *C. gigas* disponível e esta apresentou ligação incompatível com a molécula de interesse (BRIDGHAM et. al., 2014). A preparação dos modelos e estruturas experimentais testadas, assim como de caixas de atracamento para o teste de *docking* foram realizadas pelas funções *DockPrep* e *AutoDock Vina*, respectivamente, do programa UCSF Chimera (PETTERSEN, 2004). As caixas para o teste foram posicionadas na região do sítio de ligação do domínio LBD, de modo que a busca por interação da molécula ligante se concentre nesta região do domínio do receptor. Além disso, cerca de 20 resíduos completamente internos à caixa e, portanto, ao sítio de ligação, tiveram suas cadeias laterais consideradas flexíveis durante o teste, com o objetivo de permitir maiores orientações possíveis para interações entre os resíduos e o ligante, uma vez que trabalhamos em caráter investigativo com modelos. O ligante, 17- $\beta$ -estradiol, obtido da estrutura do PDB 1GWR, teve hidrogênios adicionados para pH fisiológico pelo programa Avogadro (HANWELL, 2012) em preparação para o teste. A análise dos resultados foi realizada através dos valores de estimativa da energia livre de ligação calculados pelo AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010); utilizando os programas PoseView (STIERAND; RAREY, 2010) e LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) para obter informações sobre as interações



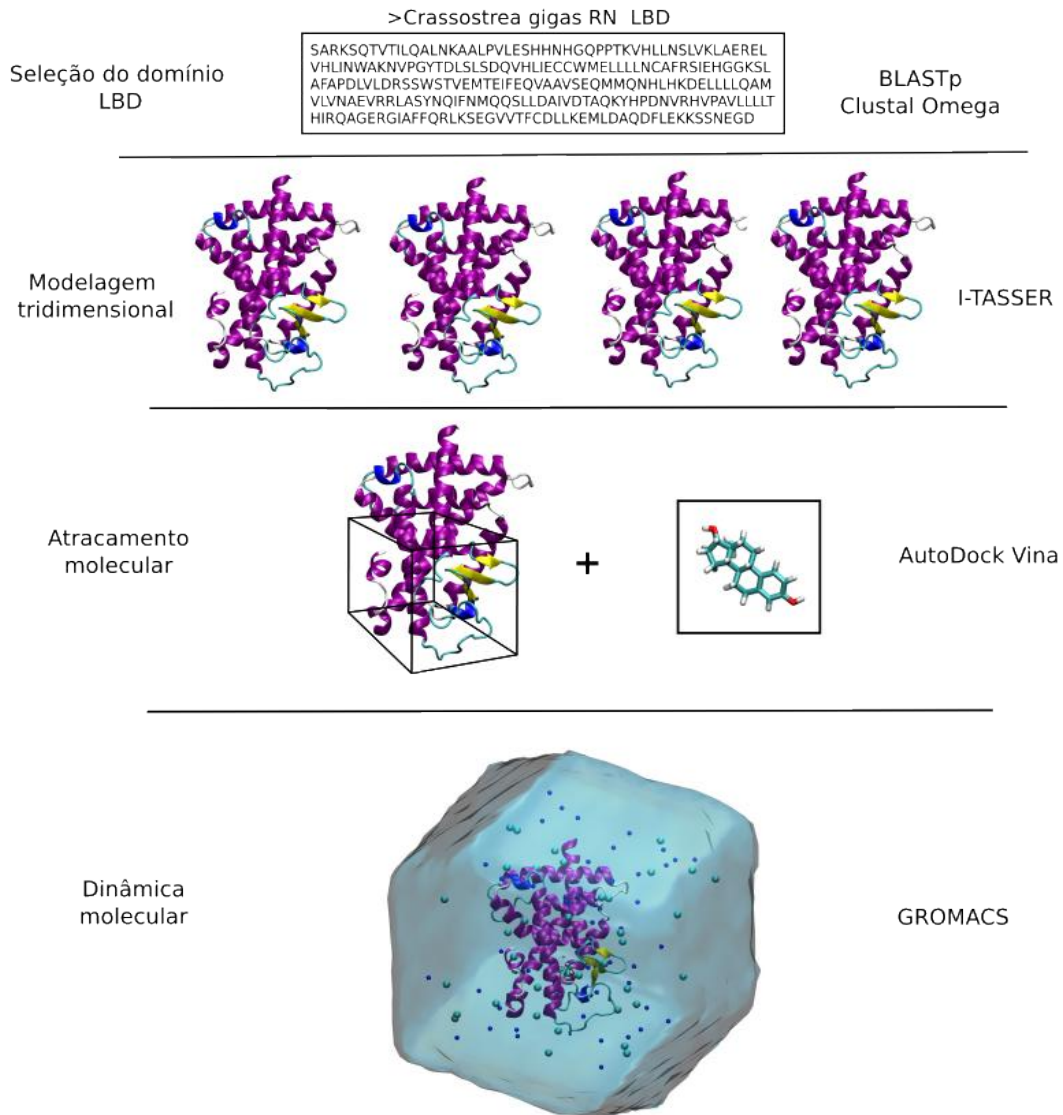
encontradas sítio de ligação; e a visualização tridimensional das posições encontradas no ensaio de atracamento molecular realizadas no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

### 3.3 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR ATOMÍSTICAS

Os RNs da ostra do Pacífico que apresentaram pelo menos uma posição da molécula de 17- $\beta$ -estradiol no sítio de ligação, no ensaio de atracamento molecular, tiveram o complexo receptor-ligante simulado via dinâmica molecular (DM). Através de simulações de DM é possível avaliar como ocorre a interação no sítio de ligação levando em conta variáveis não contempladas pelo *docking* molecular, como o tempo e um solvente. Dinâmicas moleculares atomísticas dos complexos receptor-ligante foram realizadas através do programa GROMACS 2019.3 (ABRAHAM et al., 2015). A estrutura experimental controle 1GWR do PDB possui resíduos em regiões de *loop* ausentes. Uma vez que os resíduos faltantes não compõem o sítio de ligação desta estrutura e não participam diretamente da interação com o ligante, os átomos faltantes foram desconsiderados de nossa análise. A função *DockPrep* do programa UCFS Chimera (PETTERSEN, 2004) foi utilizada para reescrever o arquivo .pdb de 1GWR no qual não constaram os átomos faltantes e essa estrutura foi, então, submetida à simulação de DM. A fim de manter a regularidade na preparação das estruturas simuladas, os 23 complexos obtidos pelo atracamento molecular também foram submetidos à função *DockPrep*. O campo de força utilizado foi o CHARMM36 e a topologia do ligante preparada pelo campo de força CGenFF (VANOMMESLAEGHE et. al., 2009). Os complexo receptor-ligante foram envoltos por uma caixa em formato de dodecaedro, a qual foi solvatada com moléculas de água, modelo SPC216, e esse sistema neutralizado com adição de 150 mM de íons. Esse complexo foi relaxado através de uma etapa denominada de minimização de energia, para se certificar de que o sistema não apresenta choques estéricos ou geometria inadequada. Em seguida, com restrição de posição para o esqueleto do receptor e do ligante, foi executada uma equilibrção de 100 picossegundos, a fim de estabilizar o sistema na temperatura padrão de 27°C e para estabelecer a orientação adequada dos componentes do sistema sobre a proteína. Subsequentemente, outra equilibrção de 100 picossegundos foi realizada para aplicação de pressão no sistema até atingir 1 Atm e a densidade adequada. Após as etapas de preparação descritas, os sistemas foram simulados pela duração de 100 nanossegundos. O programa GROMACS possui diversos módulos de análise dos resultados que utilizamos, incluindo cálculos de RMSD da proteína (*backbone*), RMSD do ligante (*backbone*), RMSF (Flutuação Quadrática Média) da proteína (carbono-alfa) e monitoramento de ligações de hidrogênio ao

longo da simulação. Além dos módulos do GROMACS, os programas PoseView (STIERAND; RAREY, 2010) e LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) foram utilizados para mapear interações não-covalentes do complexo. A visualização gráfica das trajetórias dos complexos, assim como elaboração de figuras, foi realizada no programa VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) e PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019). Utilizamos o pacote gmx\_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et. al., 2021) para calcular uma estimativa da energia de ligação de todos os complexos simulados. O cálculo de estimativa da energia de ligação por área de superfície de mecânica molecular/Poisson-Boltzmann (*Generalized-Born*) foi empregado. Este é um dos métodos mais populares para estimar energias livres de ligação em DMs (VALDÉS-TRESANCO et. al., 2021). As energias de ligação foram calculadas para os últimos 20 ns de simulação, em que os complexos receptor-ligante, em geral, apresentaram maior estabilidade. A decomposição da contribuição individual dos resíduos do sítio de ligação para a energia livre de ligação também foi realizada pelo pacote gmx\_MMPBSA. Os resíduos de uma distância de até 4 Å entre receptor e ligante foram considerados nesta análise. Os gráficos resultantes destas análises foram gerados pelo módulo gmx\_MMPBSA\_ana, do mesmo pacote. A Figura 4 mostra um esquema das etapas metodológicas do estudo.

Figura 4. Etapas metodológicas do estudo, dispostas de cima para baixo na ordem em que ocorreram. À esquerda da ilustração de cada etapa está indicada a metodologia utilizada e à direita da ilustração central consta(m) o(s) programa(s) utilizado(s) para realizá-las.



Fonte: Elaborada pela autora no programa VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) e PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

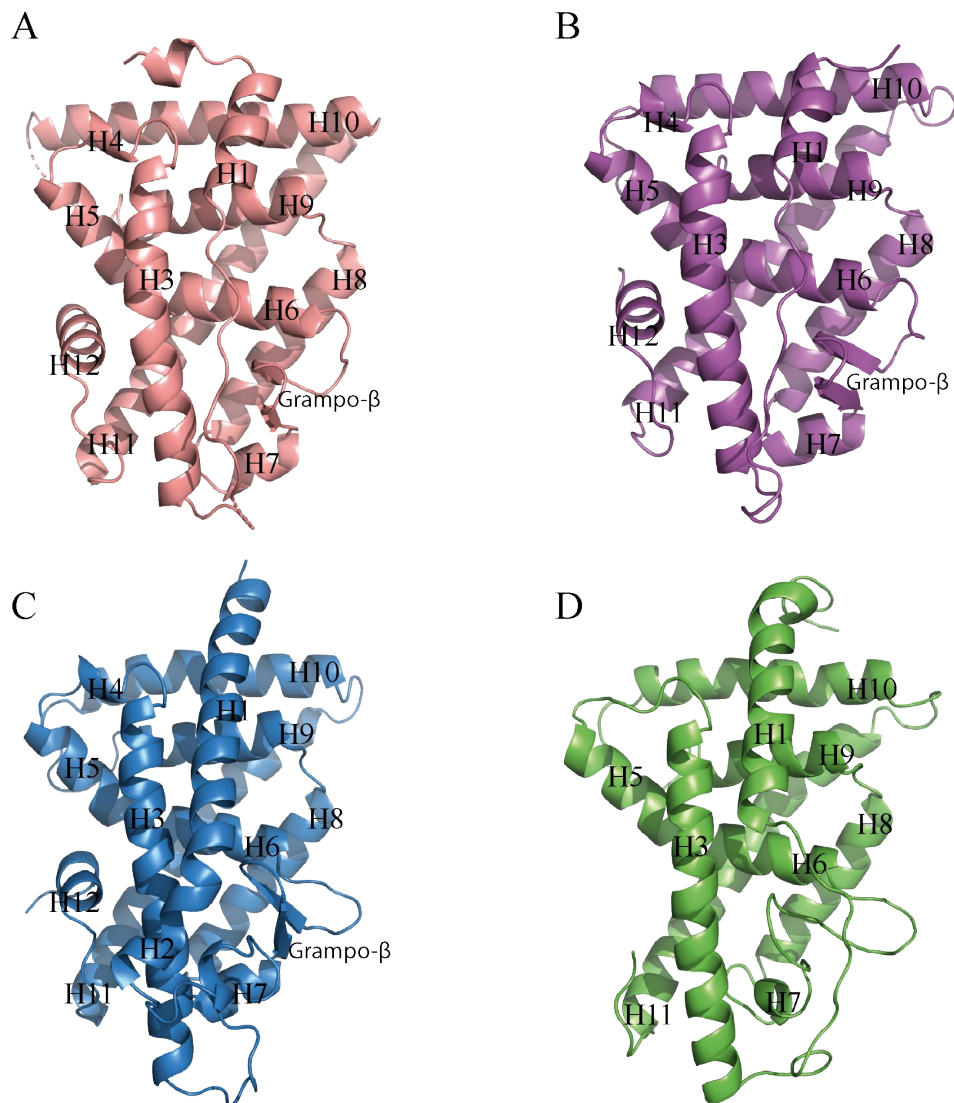
### 4.1 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO DOMÍNIO LBD

As sequências de receptores nucleares do genoma de *C. gigas* disponíveis no NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*), foram analisadas e o domínio LBD selecionado, a fim de realizar a técnica de modelagem tridimensional. Sequências da versão do genoma de 2017 (ZHANG et. al., 2012) e sequências do genoma atualizadas em 2020 (WANG et. al., 2019) foram selecionadas. Dois RNs de *C. gigas* foram descritos por Vogeler e colaboradores (2014) como apresentando apenas o domínio DBD. Dessa forma, do total de 43 RNs da espécie, trabalhamos com as sequências dos 41 RNs que possuem o domínio LBD. Por fim, a região de sequência do domínio de ligação ao ligante de cada RN foi submetida a modelagem tridimensional pelo pacote I-TASSER (ZHANG, 2008). As 41 sequências também foram submetidas ao programa PSIPRED (JONES, 1999), um preditor de formação de estrutura secundária. As previsões de enovelamento obtidas foram comparadas ao resultado estrutural obtido na modelagem, com o objetivo de verificar se a técnica de modelagem gerou o enovelamento esperado para as sequências.

O domínio LBD da superfamília de RNs possui enovelamento universal em um arranjo de três camadas antiparalelas  $\alpha$ -helicoidais, que se assemelha a um sanduíche (BOURGUET et. al., 1995; WURTZ et. al., 1996). Nele estão compreendidas uma camada de núcleo central formada por H5-H6, H9 e H10, entre duas camadas adicionais de hélices H1-H4 e H7, H8, H11. Este arranjo helicoidal cria uma estrutura que mantém uma cavidade de interação com ligante na extremidade mais estreita do domínio (LI; LAMBERT; XU, 2003). Os elementos de estrutura secundária restantes, duas folhas  $\beta$  antiparalelas, formando um grampo- $\beta$  e a H12, estão localizados na região de interação com o ligante e flanqueiam o motivo principal de três camadas (BRZOZOWSKI et. al., 1997). A função de ativação C-terminal, AF-2, que forma a H12, pode adotar múltiplas conformações dependendo do ligante presente no sítio de ligação ou a ausência deste, como uma conformação que se liga a coativadores e outra que se liga a correpressores (CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007). Comparações estruturais revelam que H4, H5, H8 e H9, que compõem o “topo” do domínio, são conservadas, sugerindo que o enovelamento em sanduíche é evolutivamente mantido para que a ligação de pequenas moléculas seja possível na maioria dos RNs (LI; LAMBERT; XU, 2003).

Os modelos tridimensionais obtidos da técnica de modelagem foram analisados individualmente, observando se estes possuem o enovelamento esperado para o domínio LBD de RNs e se a formação de estrutura secundária se aproxima do previsto pelo programa PSIPRED (JONES, 1999). A formação dos elementos de estrutura secundária H3, H5, H6, folhas- $\beta$ , H7, H8, H11 e H12 nos modelos foi considerada crucial para o objetivo de nossa análise, uma vez que esses elementos estão na vizinhança do ligante no caso do RE humano 1GWR e, portanto, delineiam o sítio de ligação com o ligante (BRZOZOWSKI et. al., 1997). Trinta modelos (CgNR1A, CgNR1B, CgNR1CDEF $\alpha$ , CgNR1CDEF $\beta$ , CgNR1D, CgNR1E, CgNR1F, CgNR1H, CgNR1Ja, CgNR1P2, CgNR1P3, CgNR1P4, CgNR1P5, CgNR1P6, CgNR1P7, CgNR1P9, CgNR1P10, CgNR1P11, CgNR2B, CgNR2E1, CgNR2E2, CgNR2E5, CgNR3A, CgNR3B, CgNR4A, CgNR5A, CgNR5B, CgNHR42, CgNR0B, Cg2DBD $\gamma$ ) apresentaram entre 10-12  $\alpha$ -hélices, formando o motivo esperado de três camadas em sanduíche e contendo todos os elementos estruturais que compõem o bolsão de interação com o ligante. Para alguns desses modelos, H2 e H4 não estão presentes, em alguns casos nem mesmo foram previstas para as sequências. Uma vez que essas hélices não constituem o sítio de ligação, sua ausência foi tolerada e esses 30 modelos foram considerados para as etapas subsequentes de análise. Onze modelos (CgNR1C, CgNR1Jb, CgNR1Jg, CgNR1P1, CgNR1P8, CgNR2A, CgNR2CD, CgNR2E3, CgNR2F, CgNHR43, Cg2DBD $\delta$ ) não corresponderam ao enovelamento esperado e previsto para o domínio LBD, e por isso sua análise foi descontinuada. O modelo CgNR1C, por exemplo, apresentou apenas 9  $\alpha$ -hélices. Para este modelo não houve formação da H2, H4 e H12, tampouco de folhas- $\beta$ . O programa de predição de estrutura secundária prevê a formação da H4, porém também não encontra para a sequência desse domínio LBD a formação de folhas- $\beta$ , H2 e H12. Realizamos modelagem por outra metodologia, o software SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018), a fim de verificar se esta outra metodologia chegava a um modelo contendo os elementos de estrutura secundária típicos, entretanto este programa também não encontrou formação de H12. Analisando a distribuição da estrutura secundária no modelo (Figura 5D) e a sequência deste LBD, é possível notar que a sequência está incompleta na região C-terminal, dando indícios de uma possível falha no sequenciamento desse LBD, ou até mesmo de alguma característica particular deste domínio nesta espécie. Entretanto, para os fins deste trabalho, a busca por semelhanças aos padrões mais conhecidos foi adotada, buscando evitar artefatos e, portanto, não incluímos nas análises subsequentes casos como esse.

Figura 5. Representação tridimensional da estrutura do domínio LBD de RNs de *C.gigas* e do RE humano 1GWR. Os elementos estruturais secundários estão legendados. (A) LBD do RE humano, PDB ID 1GWR, a estrutura resolvida experimentalmente com ligação conhecida com estradiol. (B) Modelo teórico do RE da ostra do Pacífico, CgNR3A, modelo controle em nossa análise da modelagem por ser o único receptor da espécie com estrutura experimental resolvida. (C) Modelo do RN CgNR1D, de alta qualidade segundo os critérios de análise da modelagem. (D) Modelo do RN CgNR1C, desconsiderado das análises subsequentes do estudo por não apresentar a formação de importantes elementos estruturais que compõem o sítio de ligação do LBD, como as folhas- $\beta$  e H12.



Fonte: Elaborado pela autora a partir da estrutura 1GWR do [RCSB\\_PDB](#) e dos modelos gerados pelo pacote I-TASSER (ZHANG, 2008), no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

A Figura 5 mostra a estrutura tridimensional de algumas estruturas utilizadas em nosso trabalho, representativas do grande número de modelos gerados. A estrutura experimental do RE humano, PDB ID 1GWR, está apresentada na Figura 5A, pois foi utilizada como estrutura controle na interação com o ligante de interesse em nossa investigação (estradiol), já que se liga naturalmente, e com alta afinidade, a ele. Esta estrutura experimental mostra o enovelamento típico do LBD de um RN, assim como os modelos CgNR3A (controle da técnica de modelagem, como é citado a seguir) e CgNR1D. Por fim, o modelo de CgNR1C também é apresentado, um dos modelos que demonstrou não corresponder ao enovelamento esperado e previsto para o domínio LBD, com elementos estruturais do sítio de ligação ausentes.

Crítérios quantitativos para avaliação da qualidade da estrutura proteica como o gráfico de Ramachandran, *C-score* e *Z-score* foram utilizados para avaliar a qualidade e confiabilidade dos modelos. O espaço que peptídeos ocupam no espaço é restrito, devido a impedimentos estéricos entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que os compõem (NELSON; COX, 2014). Os gráficos de Ramachandran mostram a distribuição dos ângulos dos resíduos na estrutura proteica, indicando se as restrições espaciais encontradas para a estrutura analisada, em geral, são próximas às descritas para estruturas experimentais (MORRIS et al., 1992). A Tabela 2 contém os valores do gráfico de Ramachandran gerado para os modelos de *C. gigas* (ANDERSON et. al., 2005). Apenas CgNR2A e CgNR2F não apresentaram pelo menos 90% dos resíduos de aminoácidos na estrutura proteica dos modelos em regiões altamente preferíveis. A análise desses RNs, portanto, foi descontinuada. Esses modelos também não haviam apresentado todos os elementos estruturais do domínio LBD na análise individual dos modelos. Os outros 40 RNs apresentaram valores entre 90-98,2% dos resíduos dos modelos construídos nas regiões altamente preferíveis do gráfico de Ramachandran, indicando a alta qualidade das estruturas modeladas.

A precisão global estimada dos modelos gerados pelo I-TASSER, ou seja, a confiança de cada modelo, é demonstrada quantitativamente pelo *C-score* (ZHANG, 2008). Essa métrica é calculada com base na significância dos alinhamentos do método de *threading* e nos parâmetros de convergência das simulações de montagem da estrutura. O *C-score* se encontra tipicamente na faixa de -5 a 2 e um *C-score* de maior valor significa um modelo com maior confiança. (ZHANG, SKOLNICK, 2004). Na Tabela 2 estão contidos os valores de *C-score* para os modelos gerados. Os valores encontram-se entre -2.21 e 1.21, sendo que a grande maioria possui valores positivos, e dessa forma, de boa qualidade. O *Z-score*, calculado pelo programa ProSA-web (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007), verifica se a pontuação Z da estrutura

de entrada está dentro da faixa de pontuações normalmente encontradas para proteínas nativas de tamanho semelhante, que foram experimentalmente resolvidas por cristalografia de raios-X e Ressonância Magnética Nuclear. Todos os modelos de RNs de *C. gigas* apresentam *Z-score* no alcance de estruturas experimentais de boa qualidade, com valores entre -5.05 e -8.59. Os gráficos de Ramachandran e diagramas do *Z-score* calculados para os modelos representativos apresentados na Figura 5 estão compondo o APÊNDICE B (Figuras 15-20).

Tabela 2. Parâmetros quantitativos da confiabilidade dos modelos tridimensionais dos RNs da ostra do Pacífico.

Subfamília e Grupo	Receptor Nuclear	<i>C-score</i>	Ramachandran altamente preferíveis (%)	<i>Z-score</i>	Elementos de estrutura secundária no modelo
1A	CgNR1A	0.09	94.561	-7.36	10H, 2 $\beta$
1B	CgNR1B	0.80	92.636	-7.73	10H, 2 $\beta$
1C	CgNR1C	0.02	93.833	-5.27	9H, 0 $\beta$
1D	CgNR1D	0.89	96.094	-7.22	12H, 2 $\beta$
	CgNR1CDEF $\alpha$	0.93	95.455	-7.35	11H, 2 $\beta$
	CgNR1CDEF $\beta$	01.05	94.667	-7.15	11H, 2 $\beta$
1E	CgNR1E	0.71	97.881	-7.00	11H, 2 $\beta$
1F	CgNR1F	-1.55	94.208	-7.9	12H, 2 $\beta$
1H	CgNR1H	01.06	98.268	-7.82	11H, 2 $\beta$
1J	CgNR1Ja	-0.04	92.996	-7.03	11H, 2 $\beta$
	CgNR1Jb	0.73	96.296	-7.24	11H, 0 $\beta$
	CgNR1Jg	0.20	92.050	-5.55	10H, 0 $\beta$
1P	CgNR1P1	0.99	95.690	-7.87	10H, 0 $\beta$
	CgNR1P2	0.05	92.578	-8.29	11H, 2 $\beta$
	CgNR1P3	1.07	97.807	-8.59	11H, 2 $\beta$
	CgNR1P4	0.83	95.633	-7.03	11H, 2 $\beta$
	CgNR1P5	-1.51	93.421	-7.24	10H, 2 $\beta$
	CgNR1P6	1.12	94.760	-7.05	10H, 2 $\beta$
	CgNR1P7	1.04	91.266	-6.69	10H, 2 $\beta$
	CgNR1P8	0.89	96.567	-6.89	11H, 0 $\beta$
	CgNR1P9	1.06	97.845	-7.16	10H, 2 $\beta$
	CgNR1P10	-2.21	97.425	-6.25	10H, 2 $\beta$
	CgNR1P11	0.98	96.567	-6.40	10H, 2 $\beta$
2A	CgNR2A	-1.73	86.611	-7.58	10H, 0 $\beta$
2B	CgNR2B	-0.23	93.077	-7.3	11H, 2 $\beta$
2C	CgNR2CD	0.21	96.680	-5.72	10H, 2 $\beta$
2E	CgNR2E1	0.64	93.416	-6.84	11H, 2 $\beta$
	CgNR2E2	0.24	90.083	-6.93	10H, 2 $\beta$



	CgNR2E3	0.98	91.518	-6.58	11H, 2 $\beta$
	CgNR2E5	0.61	90.500	-6.87	11H, 2 $\beta$
2F	CgNR2F	-0.18	87.347	-7.15	11H, 0 $\beta$
3A	CgNR3A	1.21	94.643	-7.72	11H, 2 $\beta$
3B	CgNR3B	0.30	95.816	-6.21	10H, 2 $\beta$
4A	CgNR4A	-0.03	96.250	-7.91	12H, 2 $\beta$
5A	CgNR5A	-1.43	98.319	-7.81	11H, 2 $\beta$
5B	CgNR5B	-1.70	96.596	-7.00	11H, 2 $\beta$
0B	CgNR0B	0.54	96.491	-5.05	10H, 2 $\beta$
2DBDNR	Cg2DBD $\gamma$	1.07	97.403	-6.54	11H, 2 $\beta$
	Cg2DBD $\delta$	0.77	92.340	-6.47	10H, 0 $\beta$
Não atribuído	CgNHR42	0.73	96.491	-7.15	10H, 2 $\beta$
	CgNHR43	-1.02	95.855	-6.07	9H, 2 $\beta$

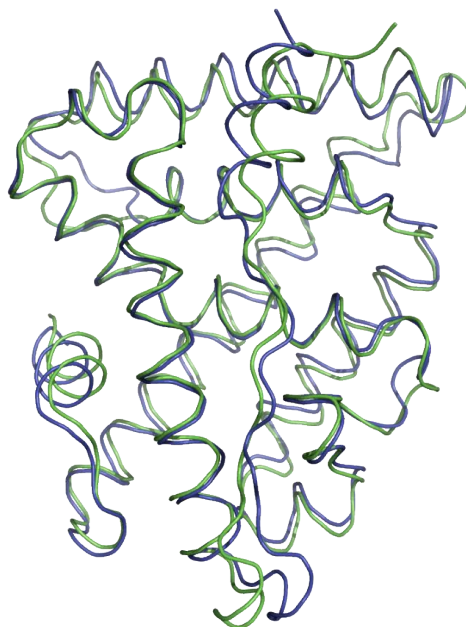
Legenda: H:  $\alpha$ -hélices;  $\beta$ : folhas- $\beta$ .

Fonte: Elaborada pela autora a partir dos resultados obtidos pelos programas I-TASSER (ZHANG, 2008), para *c-score*, Ramachandran Plot Server Z-lab (ANDERSON et. al., 2005) para valores de Ramachandran e ProSA (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007), para *z-score*.

O RN CgNR3A (Figura 5B) representa nosso modelo controle na análise de modelagem, uma vez que é o único RN da ostra do Pacífico com estrutura do domínio LBD resolvida experimentalmente. Para gerar o modelo para essa sequência, foi retirada manualmente das possibilidades de moldes utilizados pelo I-TASSER a própria estrutura experimental deste receptor (PDB ID: 4N1Y). Seguindo o mesmo procedimento de modelagem que os demais RNs, CgNR3A foi construído utilizando sequências similares encontradas pelos algoritmos do programa de modelagem pelo método de *threading*. O modelo resultante foi alinhado com a estrutura experimental, 4N1Y, para avaliar se a técnica de modelagem atinge um modelo similar ao que é conhecido experimentalmente. O alinhamento das estruturas tridimensionais 4N1Y e do modelo CgNR3A de *C. gigas* está apresentado na Figura 6, demonstrando boa sobreposição dos elementos de estrutura secundária para esses LBDs. A similaridade entre modelo e estrutura experimental foi calculada através da ferramenta *TM-align* (ZHANG, SKOLNICK, 2005), a qual leva em conta parâmetros como RMSD e *TM-score*. O cálculo de RMSD (Desvio Quadrático Médio) é a medida da distância média entre os átomos de proteínas otimamente alinhadas. Quanto mais próximo de 0 o valor de RMSD, mais similares são as estruturas comparadas. O valor de RMSD entre 4N1Y e o modelo CgNR3A é de 1.55 Å. O *TM-score* (do inglês *Template Modeling score*) verifica a similaridade de distribuição espacial de estruturas proteicas.

Pontuações abaixo de 0,17 correspondem a proteínas não relacionadas, enquanto que estruturas com uma pontuação maior que 0,5 geralmente assumem o mesmo enovelamento. O modelo de CgNR3A e a estrutura experimental 4N1Y apresentam *TM-score* de valor 0.934. Dessa forma, verificamos boa similaridade estrutural, através do RMSD e *TM-score*, assim como boa sobreposição das estruturas tridimensionais (Figura 6), indicando que a técnica de modelagem alcançou uma estrutura muito similar à conhecida experimentalmente para esse receptor.

Figura 6. Alinhamento da estrutura experimental do RE de *C. gigas* (em azul), PDB ID 4N1Y, e do modelo CgNR3A construído por modelagem tridimensional para essa sequência da ostra do Pacífico (em verde).

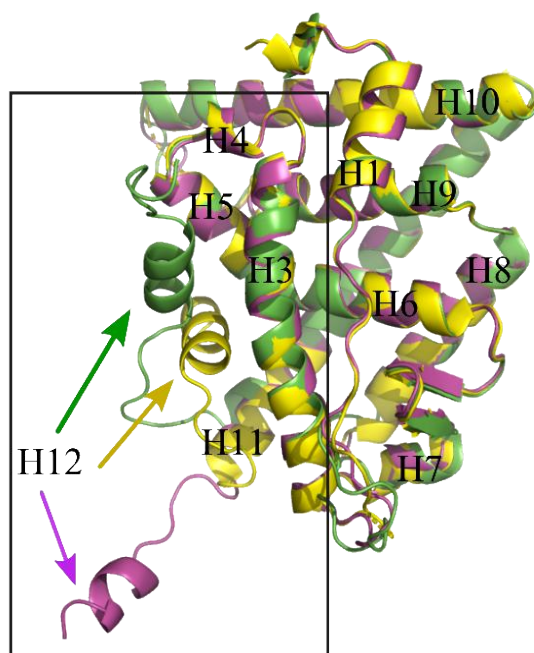


Fonte: Elaborada pela autora utilizando modelo gerado pelo pacote I-TASSER (ZHANG, 2008) e estrutura experimental disponível no PDB, de código 4N1Y. Figura gerada no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

A Função de Ativação 2 (AF-2), presente no domínio LBD formando H12, desempenha um papel fundamental na modulação da transcrição gênica, uma vez que essa região muda sua conformação de acordo com a presença e a natureza do ligante que interage com o sítio de ligação (LI; LAMBERT; XU, 2003). A H12 é essencial para a transativação de RNs, pois tanto a perda quanto a mutação nesta região resultam em um receptor que não responde ao ligante (DANIELIAN et. al., 1992; BRZOZOWSKI et. al., 1997). O RE humano, por exemplo, possui pelo menos três conformações da região de H12 conhecidas. Uma delas é a forma Apo, ou seja, sem o ligante associado, em que a H12 está estendida para longe do

LBD e totalmente solvatada (CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007). Outra conformação é a agonista, resultante do rearranjo da H12 ao se ligar com a molécula de estradiol, formando uma “tampa” sobre a cavidade de interação com o ligante, compactada contra H3, H5-H6 e H11 (BRZOZOWSKI et. al., 1997). Essa conformação é essencial para o recrutamento e interação com co-ativadores. Por fim, também é descrita uma conformação antagonista, quando o ligante presente no sítio de ligação, como Tamoxifeno ou Raloxifeno, previnem a formação de uma conformação de AF-2 transcricionalmente favorável (LONARD; SMITH, 2002). A conformação da H12 assume um encaixe sobre H5 e a extremidade C-terminal da H3, ocupando uma parte da região de ligação da molécula co-ativadora. Ocorre um reposicionamento da H12 em direção à região N-terminal do LBD em comparação com a conformação induzida pelo ligante agonista (BRZOZOWSKI et. al., 1997; CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007). A Figura 7 mostra as estruturas cristalográficas de RE humano em sua conformação Apo (PDB ID 1A52), ligado a uma molécula agonista (PDB ID 1GWR) e associado a um antagonista (PDB ID 3ERT). Estas estruturas experimentais foram alinhadas a cada um de nossos modelos, a fim de avaliar qual conformação da H12 foi modelada para cada caso. Todos os modelos gerados possuem H12 tampando o sítio de ligação, na conformação de associação com ligantes agonistas. Uma vez que as conformações são determinantes para etapas posteriores de interação, neste trabalho buscamos posições favoráveis à formas agonistas de ligação.

Figura 7. Alinhamento da estrutura 3D do RE humano em sua conformação Apo (em roxo), conformação antagonista (em verde) e agonista (em amarelo). O retângulo em preto destaca a região onde se encontra a H12. Na conformação agonista, que corresponde à estrutura do RE humano 1GWR, a H12 encontra-se formando uma “tampa” sobre a cavidade de interação com o ligante, compactada contra H3, H5-H6 e H11, conformação conhecida como transcricionalmente favorável. Já a orientação da H12 antagonista, representada pela estrutura experimental do RE humano 3ERT, está posicionada sobre H5 e a extremidade C-terminal da H3, configuração conhecida como desfavorável ao recrutamento para transcrição. Em sua orientação Apo, proveniente da estrutura experimental 1A52, a H12 está afastada do restante do domínio LBD.



Fonte: Elaborada pela autora utilizando o programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

#### 4.2 ATRACAMENTO MOLECULAR PROTEÍNA-LIGANTE

Os ensaios de atracamento molecular foram realizados pelo programa Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010), testando a interação de 29 modelos de qualidade com a molécula 17- $\beta$ -estradiol. A estrutura experimental do RE da ostra, PDB ID 4N1Y, foi utilizada para a realização do ensaio deste RN, pois este é o único RN com estrutura resolvida da espécie. Esta estrutura foi utilizada como controle negativo no atracamento molecular e dinâmica molecular (DM), uma vez que sua ligação com o hormônio estradiol foi demonstrada incompatível devido a impedimentos estéricos no sítio de ligação, o qual apresenta volume reduzido para comportar este ligante (BRIDGHAM et. al., 2014). Para análise e comparação dos resultados obtidos no teste de atracamento molecular, o RE humano 1GWR foi utilizado como controle positivo, uma vez que possui ligação detalhadamente caracterizada com o ligante de interesse em nossa análise (BRZOZOWSKI et. al., 1997; CELIK; LUND; SCHIÖTT, 2007). Dessa forma, foi realizado *redocking* do RE humano com estradiol, ou seja, o ligante foi removido e reposicionado novamente na cavidade para avaliar valores correspondentes à energia livre de ligação e ligações não-covalentes no sítio de ligação. Para sete dos 29 modelos de RNs (CgNR1CDEF $\alpha$ , CgNRIF, CgNR1P4, CgNR1P6, CgNR1P7, CgNR4A, Cg2DBD $\gamma$ ) o teste de atracamento molecular não encontrou nenhuma orientação de ligação possível do estradiol no sítio de ligação. Para 22 modelos (CgNR1A, CgNR1B,

CgNR1CDEF $\beta$ , CgNR1D, CgNR1E, CgNR1H, CgNR1Ja, CgNR1P2, CgNR1P3, CgNR1P5, CgNR1P9, CgNR1P10, CgNR1P11, CgNR2B, CgNR2E1, CgNR2E2, CgNR2E5, CgNR3B, CgNR5A, CgNR5B, CgNHR42, CgNR0B) e para as estruturas experimentais 1GWR e 4N1Y, o ensaio encontrou ao menos uma posição de ligação da molécula alvo no sítio de ligação do LBD.

O sítio de ligação do RE humano reconhece o ligante 17- $\beta$ -estradiol através de uma combinação de ligações de hidrogênio específicas e da complementaridade da cavidade de ligação ao caráter hidrofóbico desta molécula (BRZOZOWSKI et. al., 1997). Uma vez que as interações polares demonstram protagonismo no ancoramento do ligante e manutenção da estabilidade do complexo na estrutura controle (CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007), destacamos essas interações encontradas na posição de menor  $\Delta G$  para cada RN nos ensaios de atracamento molecular na Tabela 3. A Tabela 3 apresenta dados quantitativos ( $\Delta G$ ) e qualitativos (interações polares) obtidos no atracamento molecular em ordem das menores energias de ligação encontradas, além de apresentar as relações de homologia com RNs de espécies modelo para referência. Os dados de *redocking* do RE humano 1GWR estão presentes na Tabela 3 para comparação.

Tabela 3. Valores estimados de energia livre de ligação e interações polares encontrados nos ensaios de atracamento molecular para os RNs da ostra do Pacífico e o 17- $\beta$ -estradiol. As relações de homologia dos receptores da ostra com vertebrados e invertebrados estão destacadas para referência.

RN	Homólogos	$\Delta G$ (kcal/mol)	Interações polares
1GWR*	RE	-11.2	E353, R394, H524
CgNHR42	Desconhecido	-11.7	A111
CgNR1D	Rev-Erb, NHR85	-11.4	D251
CgNR1P10	Desconhecido	-11.1	-
CgNR5A	SF1, LRH	-11.1	L107, A212
CgNR2E1	TLX	-11.0	M44, V117, F120
CgNR2E5	HR83	-10.6	N32, F76
CgNR3B	ERR, DERR	-10.5	L89
CgNR1Ja	DHR96, DAF12	-10.3	S106, D243
CgNR1B	RAR	-9.9	L134
CgNR1P9	Desconhecido	-9.8	-
CgNR2B	RXR	-9.8	P245
CgNR1A	THR	-9.7	-

CgNR1E	E78	-9.6	W59
CgNR2E2	TLL	-9.5	-
CgNR1P2	Desconhecido	-9.4	D47, K132
CgNR1P11	Desconhecido	-9.4	D214
CgNR5B	DHR39	-9.0	H115
CgNR1H	LXR	-8.8	S58
4N1Y*	RE	-8.8*	-
CgNR0B	DAX1, SHP	-8.2	-
CgNR1P3	Desconhecido	-7.0	E43, T117
CgNR1P5	Desconhecido	-6.9	Y98
CgNR1CDEF $\beta$	MgNR1DEF	-5.1	-

\* Foram utilizadas estruturas experimentais para a realização do atracamento molecular.

Fonte: Elaborada pela autora a partir das relações de homologia estabelecidas no trabalho de Vogeler et. al. (2014), valores de  $\Delta G$  obtidos pelo programa Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010) e interações polares identificadas utilizando os programas LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) e PoseView (STIERAND; RAREY, 2010).

Os resultados de energia livre de ligação obtidos no atracamento molecular corroboram os dados experimentais do ponto de vista das estruturas controles do ensaio. O RE humano 1GWR configura uma das ligações mais favoráveis com o estradiol encontradas no teste, apresentando uma das menores energias de ligação e interações polares que já foram descritas por dados experimentais entre esse complexo receptor-ligante (BRZOZOWSKI et. al., 1997; CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007). Por outro lado, como esperado para um controle negativo, o RE da ostra 4N1Y não demonstrou interações polares com este ligante, além de uma das maiores energias de ligação de todos os RNs testados. Em nossa análise dos resultados e da metodologia utilizada, entendemos que o ensaio de atracamento molecular considerando resíduos do sítio de ligação com flexibilidade de suas cadeias laterais, não ocorre sem a geração de artefatos. A flexibilização da proteína inerente ao ensaio, viabiliza ajustes de muitas posições possíveis do ligante, possivelmente gerando falsos-positivos, simulando alguns ajustes induzidos. Acreditamos que este tenha sido o caso para as orientações de ligação possíveis entre 4N1Y e o estradiol, ligação considerada incompatível segundo dados da literatura (BRIDGHAM et. al., 2014). As limitações de ensaios de *docking* molecular, como a geração de artefatos, são reconhecidas e descritas na literatura (OKIMOTO et. al., 2009; VERLI, 2014;). Não obstante, a técnica utilizada foi capaz de apresentar resultados dentro do esperado para a estrutura experimental 1GWR, como citado acima, demonstrando correspondência com dados experimentais da literatura (BRZOZOWSKI et. al., 1997; CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007). Neste trabalho consideramos, portanto, que a

flexibilização da estrutura proteica durante a interação pode ser uma forma de melhor amostrar o espaço conformacional para favorecer interações desconhecidas. Nesse caso, ampliam-se as possibilidades de interação, porém, aumentam-se as chances de artefatos na ligação.

O ensaio de atracamento molecular utilizado, apesar de imprimir certa flexibilidade à estrutura proteica, desconsidera aspectos como a dinâmica de movimento de todo o complexo, a variação na posição da proteína e ligante ao longo do tempo e a presença de um solvente, pertinentes para a avaliação da formação de um complexo proteína-ligante estável (GANESAN; COOTE; BARAKAT, 2017; OKIMOTO et. al., 2009). Assim sendo, a realização de DMs, simulações contendo a presença das importantes variáveis citadas, se demonstraram fundamentais em nossa abordagem de propor candidatos prováveis de ligação com a molécula alvo. Portanto, os ensaios de atracamento molecular forneceram complexos receptor-ligante que utilizamos como ponto de partida para realização de DMs atomísticas, objetivando um nível de detalhamento mais acurado da caracterização do complexo.

#### 4.3 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR ATOMÍSTICAS

Todos os modelos com ao menos um modo de ligação possível com o estradiol tiveram o complexo receptor-ligante de menor energia livre encontrado no *docking* simulado via dinâmica molecular. Para a estrutura controle 1GWR, o complexo simulado foi o disponível no PDB. Simulações de 100 ns foram realizadas para os complexos. Utilizamos o pacote gmx\_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et. al., 2021) para realizar estimativas da energia livre de ligação de todos os complexos simulados. As energias de ligação foram calculadas para os últimos 20 ns de simulação, pois observamos em outros trabalhos de DM da literatura (LI et. al., 2015) e em nossos gráficos de RMSD, apresentados e discutidos adiante, que o ligante encontra uma posição de menor desvio médio e, em geral, ocorre a formação de um complexo de maior estabilidade nos 20 ns finais da simulação. A Tabela 4 apresenta a estimativa da variação de entalpia para a energia livre de ligação dos complexos receptor-ligante em ordem dos de menor energia para os de maior energia.

Tabela 4. Valores estimados de variação da entalpia para os complexos receptor-ligante durante os 20 nanossegundos finais das simulações de dinâmica molecular.

Receptor nuclear	$\Delta H$ (kcal/mol)
1GWR*	-22.3045
CgNR1P11	-29.2950
CgNR0B	-28.5914
CgNR2E2	-27.2204
CgNR2E5	-26.9463
CgNR1P10	-23.4185
CgNR1D	-23.4079
CgNR2E1	-22.9255
CgNR2B	-21.8969
CgNHR42	-21.4894
CgNR1H	-21.4731
CgNR1B	-20.9809
CgNR3B	-20.4890
CgNR1P9	-20.2108
CgNR1P3	-19.1060
4N1Y*	-18.9498
CgNR1E	-18.9038
CgNR1A	-18.5639
CgNR5A	-18.3982
CgNR1Ja	-17.7333
CgNR1P5	-16.7731
CgNR1CDEF $\beta$	-16.6041
CgNR1P2	-16.5580
CgNR5B	-16.1024

\* Foram utilizadas estruturas experimentais para a realização das simulações de DM.

Fonte: Elaborado pela autora a partir dos resultados obtidos pelo pacote gmx\_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et. al., 2021).

Os valores de energia de ligação proteína-ligante apresentados consideram as contribuições entálpicas para o cálculo, ou seja, a variação da entalpia ( $\Delta H$ ), enquanto que as contribuições entrópicas não estão incluídas. Isso se deve ao fato de que, ao analisar os resultados de energia livre de ligação das simulações, os dados calculados para as contribuições entálpicas se aproximaram mais dos dados experimentais. Outras análises de energia livre de ligação em simulações de DMs atomísticas, como no trabalho de Li e colaboradores (2015), também com receptores nucleares, encontraram valores favoráveis de

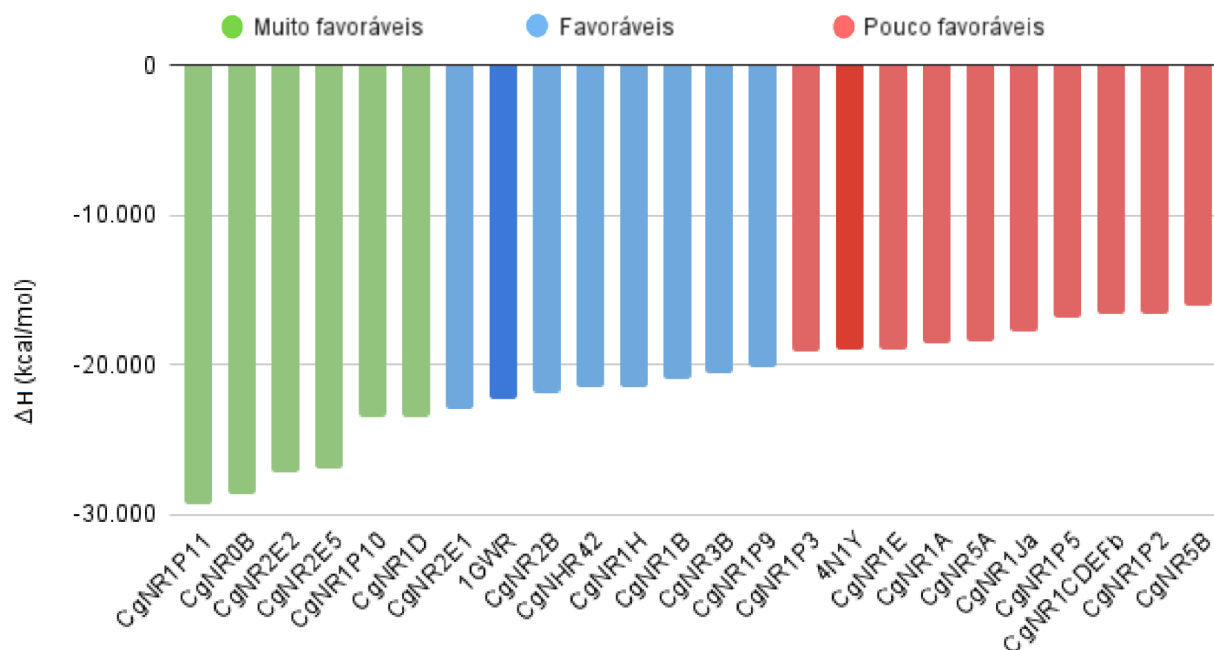


interação considerando apenas as contribuições entálpicas à  $\Delta G$ . Os valores de variação da entalpia descritos pelos autores são, inclusive, próximos aos encontrados em nossos experimentos de simulação.

A fim de indicar candidatos mais prováveis de ligação com o estradiol, realizamos uma classificação dos RNs a partir dos valores de energia de ligação calculados, em categorias de candidatos muito favoráveis, favoráveis e pouco favoráveis à interação com o ligante de interesse. Para esta classificação, calculamos a média de energia entre todos os complexos simulados. Em seguida, somamos e subtraímos do valor médio o total de 0,5 vezes o desvio padrão para esse conjunto de dados. Através desse cálculo, atingimos seis candidatos mais favoráveis à ligação com o ligante, os quais apresentaram os menores valores de energia de ligação, de -23.40 a -29.29 kcal/mol. Os candidatos favoráveis apresentaram valores médios de energia de ligação, considerando o conjunto de dados, variando de -20.21 a -22.92 kcal/mol. Já os candidatos pouco favoráveis possuem os maiores valores de  $\Delta H$ , entre -16.10 a -19.10 kcal/mol. A Figura 8 apresenta esta classificação de candidatos, que estão coloridos segundo as categorias atribuídas.

Figura 8. Classificação dos receptores nucleares em candidatos muito favoráveis, favoráveis e pouco favoráveis à ligação com estradiol, a partir dos valores de energia de ligação. Os candidatos mais favoráveis estão coloridos em verde, os favoráveis em azul e os pouco favoráveis em vermelho. As barras que representam as estruturas de controle positivo 1GWR (azul escuro) e negativo 4N1Y (vermelho escuro) estão destacadas.

## Classificação de candidatos



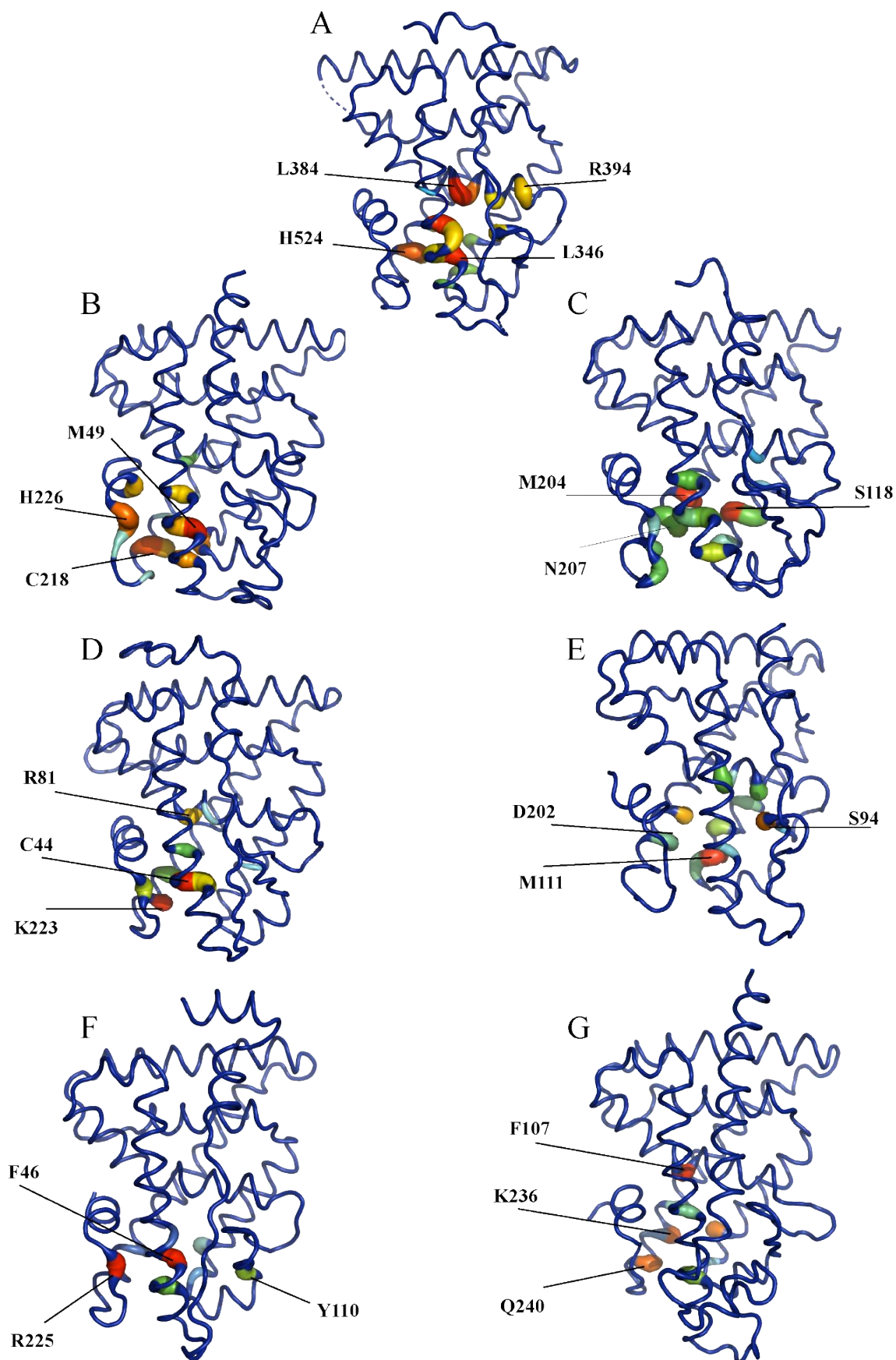
Fonte: Elaborada pela autora a partir de cálculos de média e desvio padrão dos valores de energia livre de ligação obtidos pelo pacote gmx\_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et. al., 2021). Figura elaborada no [Google Sheets](#).

Assim como no resultado dos ensaios de atracamento molecular, as estruturas experimentais de controle seguiram o perfil esperado para o que conhecemos de dados experimentais nas simulações de DM. A estrutura experimental do RE da ostra do Pacífico, 4N1Y, foi agrupado através dos cálculos de classificação entre os candidatos pouco favoráveis a interagir com o estradiol, devido ao seu valor de energia livre estar entre os maiores. Por outro lado, o RE humano 1GWR apresentou energia livre de ligação menor, com valores próximos aos candidatos de interação muito favoráveis, e foi agrupado com candidatos favoráveis.

Com a finalidade de obter um perfil detalhado acerca dos complexos receptor-ligante, a energia livre de ligação total foi decomposta para a contribuição individual de cada resíduo que compõe o sítio de ligação dos RNs. Para estes cálculos, utilizamos novamente o pacote gmx\_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et. al., 2021). A decomposição por resíduo realizada compreendeu todos os resíduos a 4 Å de distância do ligante. Os resultados para os candidatos mais favoráveis estão apresentados na Figura 9, em que a estrutura tridimensional é representada pela cadeia principal da proteína. Para destacar os resíduos que mais contribuem para a diminuição da energia de ligação, utilizamos a representação de espessura e cor da coluna *B-factor* do programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019). Os resíduos estão coloridos

de vermelho a azul (contribuição mais negativa a mais positiva para a diminuição da energia de ligação). Quanto maior a espessura, portanto, mais relevante é a interação. A visualização da decomposição dos resíduos dos seis candidatos muito favoráveis à ligação ao estradiol pode ser visualizada em forma de gráfico de colunas no APÊNDICE C (Figuras 21-26).

Figura 9. Representação da análise de decomposição dos resíduos do sítio de ligação para os candidatos muito favoráveis de interação com estradiol e a estrutura de controle positivo (1GWR). Os valores de energia para cada resíduo são ilustrados por cores e espessura, variando de resíduos que mais contribuem para a diminuição da energia livre de ligação (vermelho e mais grosso) para resíduos que menos contribuem para a diminuição da energia de ligação (azul e mais fino). Os resíduos que mais contribuem para o valor de energia de ligação negativo estão indicados para cada estrutura. (A) Estrutura experimental do RE humano, PDB ID 1GWR. (B) Modelo de CgNR1P11. (C) Modelo de CgNR0B. (D) Modelo de CgNR2E2. (E) Modelo de CgNR2E5. (F) Modelo de CgNR1P10. (G) Modelo de CgNR1D.



Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados de decomposição de resíduos do pacote gmX\_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et. al., 2021), no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

A interação do RE humano com o hormônio estradiol ocorre através da ligação desta molécula entre H3, H6 e H11, onde o ligante adota uma conformação de baixa energia. A hidroxila fenólica do anel A do ligante posiciona-se entre H3 e H6 e faz ligações de hidrogênio diretas com Glu353 e Arg394. A hidroxila do anel D faz uma ligação de hidrogênio com His524 em H11. O esqueleto não polar do ligante participa de uma série de contatos hidrofóbicos, com as cadeias laterais de Ala350, Leu387, Phe404, Ile424, Gly521 e Leu525 (BRZOZOWSKI et. al., 1997). Dessa forma, as interações não-covalentes entre receptor-ligante possuem papel fundamental na estabilização da ligação e foram alvo de nossa análise ao comparar as interações polares e não polares presentes no sítio de ligação dos modelos após as simulações de DM. Em nossa análise das simulações, as interações que mais contribuem para a diminuição da energia livre de ligação do RE humano 1GWR, envolvem resíduos como Arg394 e His524, chave para a interação de RE humano com o hormônio estradiol segundo dados experimentais e teóricos (BRZOZOWSKI et. al., 1997). Estes resíduos realizam interações polares imprescindíveis para o ancoramento e estabilização do complexo RE-estradiol em humanos (CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007). A contribuição do resíduo Glu353 para a diminuição da energia livre de ligação não foi marcante em nossos resultados, no entanto, outros resíduos próximos a este, em H3, como Leu346 e Ala350, ainda que com interações apolares, foram relevantes para a diminuição da energia livre de ligação. Outros resíduos demonstraram grande contribuição para a  $\Delta H$  negativo, como Leu387, em H6 e Leu525 em H11. A presença de resíduos que mais contribuíram para a diminuição da energia livre de ligação está nas hélices H3, H6 e H11, assim como o já descrito para o RE humano (BRZOZOWSKI et. al., 1997). A contribuição dos resíduos que não estão indicados na Figura 9 podem ser verificadas no APÊNDICE C.

De acordo com os resultados da decomposição de resíduos para a energia livre de ligação, identificamos alguns padrões envolvendo os candidatos muito favoráveis à ligação com a molécula alvo. Os candidatos muito favoráveis apresentaram resíduos que mais contribuíram para a energia de ligação total em H3, H6, em uma folha- $\beta$ , H8, H11 e entre H11-H12. A maioria dos modelos candidatos muito favoráveis tiveram resíduos fundamentais em H3, H6 e H11, assim como ocorre na estrutura controle 1GWR. Em geral, esses receptores apresentaram a maioria dos seus resíduos do sítio de ligação contribuindo cerca de -1.0 kcal/mol e também contaram com resíduos marcantes, contribuindo com um valor menor ou igual a -2.0 kcal/mol para a energia livre de ligação.

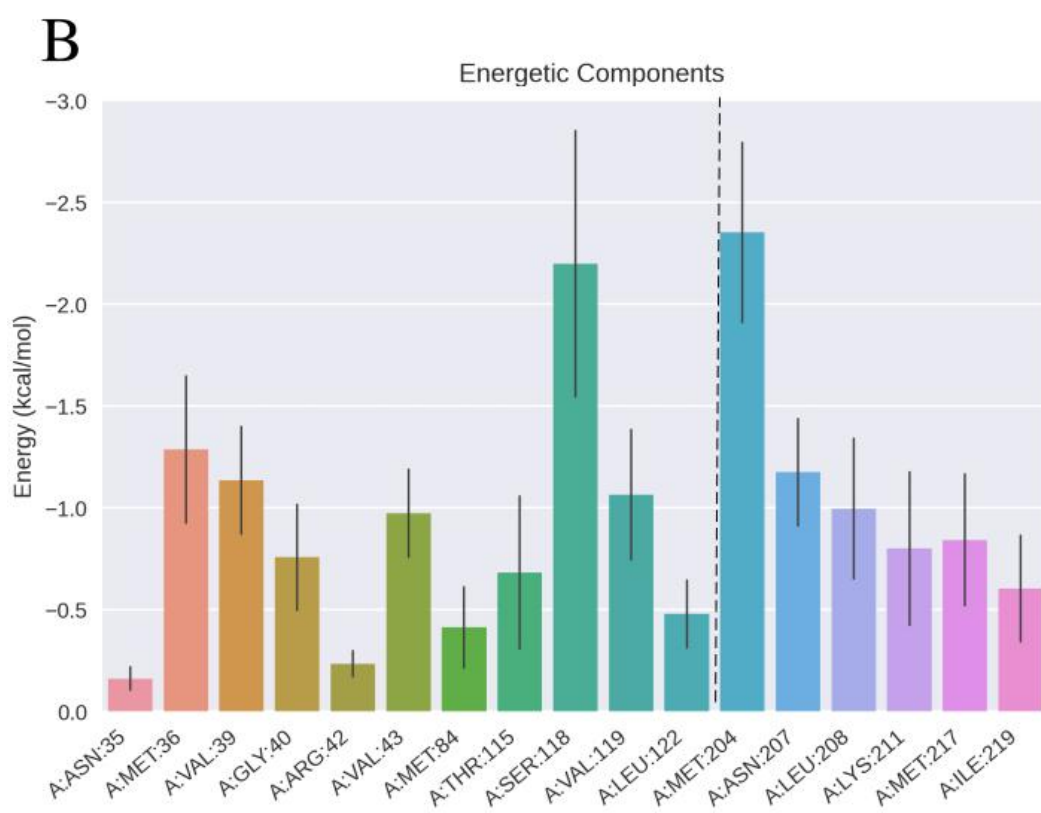
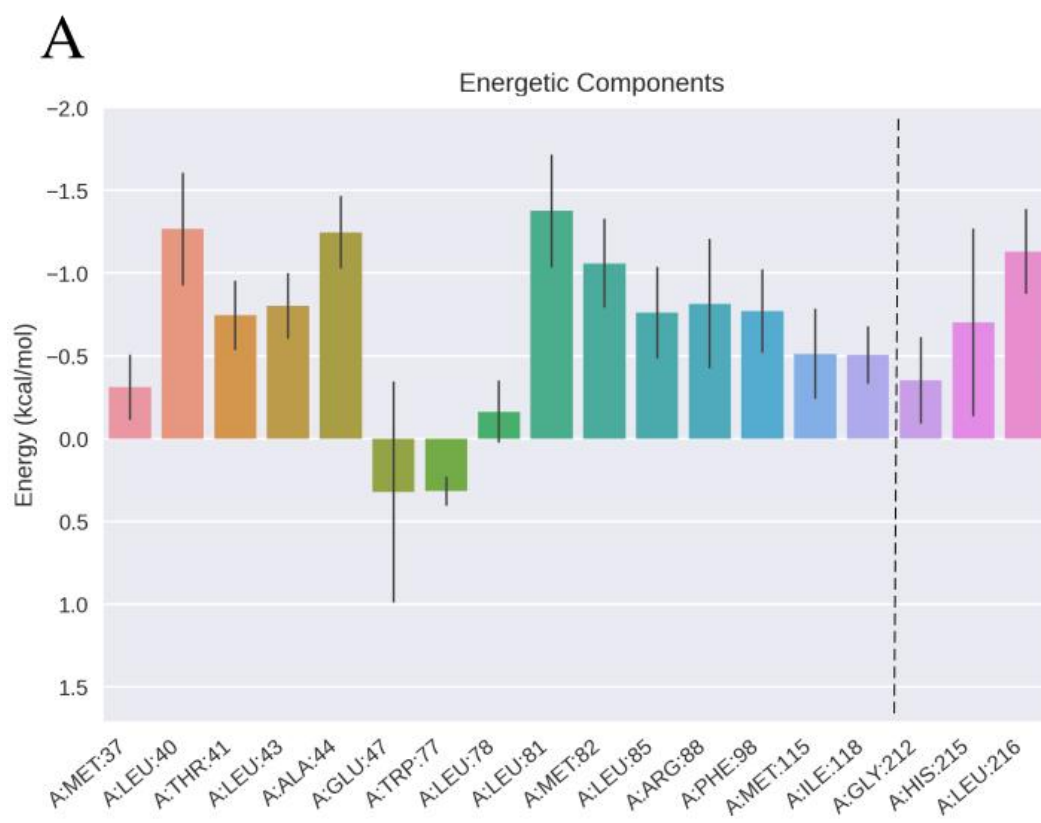
O RE de vertebrados apresenta um importante papel dos resíduos localizados em H11 para a formação do complexo receptor-ligante com ligantes agonistas e antagonistas

(SUMBAYEV et. al., 2005). Diversos estudos, como de mutagênese sítio-dirigida, demonstraram que mutações em resíduos 521-528, localizados em H11, tiveram efeitos significativos na transcrição induzida por E2 (EKENA et. al., 1996). A mutação de Gly525 do ER de camundongo, por exemplo, aboliu quase completamente a ligação e a atividade do estradiol (DANIELIAN et. al., 1993). Nessa região do LBD, o resíduo His524 forma uma ligação de hidrogênio estável com o hormônio estradiol, determinante para a seleção conformacional induzida por este ligante (CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007; SUMBAYEV et. al., 2005). Celik, Lund & Schiøtt (2007) demonstraram por estudos de dinâmica molecular que através da ligação de hidrogênio entre His524 e o anel D do estradiol, uma rede de ligações de hidrogênio partindo de His524 a Glu339, em H3, via Glu419 e Lys531, também em H11, mantém a H3 e a H11 em contato próximo, presumivelmente evitando que o ligante escape da cavidade do LBD. Essa rede de interações mantém a H12 na posição agonista flanqueando o sítio de ligação, pois a H11 está fixa e menos móvel (STEINMETZ; RENAUD & MORAS, 2001). Esse modelo do complexo agonista parcialmente estabilizado pela presença de uma rede conservada de ligações de hidrogênio que agrupa H3 e H11, proposto por Steinmetz, Renaud e Moras (2001), evidencia o papel central de His524 para a manutenção do complexo estável. Comparando os resíduos do sítio de ligação do RE humano com o RE de *C. gigas*, os resíduos que correspondem a Glu353, Arg394 e Phe404 no ER- $\alpha$  humano são conservados. Estes resíduos fazem contato com o anel A de E2 (MATSUMOTO et al., 2007). No entanto, o resíduo His524 do RE humano, que faz uma única ligação de hidrogênio com o anel D, é substituído no sítio de ligação da ostra. O RE da ostra, ao que todos os dados experimentais sugerem, não apresenta ligação com o hormônio estradiol (BRIDGHAM et. al., 2014), demonstrando, mais uma vez, que a presença de resíduos em H11, como His524, são determinantes para a ligação com estradiol.

Nossos resultados de decomposição de resíduos para os candidatos mais favoráveis de ligação ao estradiol demonstraram um protagonismo dos resíduos posicionados em H11 para a manutenção de uma energia livre de ligação baixa. Todos os candidatos muito favoráveis apresentam resíduos em H11 com contribuições de pelo menos -1.0 kcal/mol para a  $\Delta H$ , sendo que para alguns RNs, como CgNR0B e CgNR2E2, a contribuição de resíduos em H11 ultrapassa -2.0 kcal/mol. A Figura 10 mostra a decomposição de resíduos para o controle positivo, 1GWR (A) e para o candidato muito favorável CgNR0B (B), evidenciando o padrão de participação de resíduos em H11 citado. De maneira oposta, os RNs classificados como candidatos pouco favoráveis não apresentam esse perfil de resíduos em H11 em destaque na manutenção da  $\Delta H$  negativa. O controle negativo, o RE da ostra, PDB ID 4N1Y, não

apresenta nenhum resíduo em H11 com contribuição que alcance  $-0.5$  kcal/mol. De maneira semelhante, a maioria dos candidatos pouco favoráveis não alcança  $-1.0$  kcal/mol de contribuição nos resíduos em H11 e, em geral, possuem uma menor porcentagem de resíduos que contribuem para a diminuição da energia livre de ligação nessa hélice. Como exceção para esse padrão, os candidatos pouco favoráveis da subfamília NR5, CgNR5A e CgNR5B, possuem resíduos que alcançam  $-1.0$  kcal/mol de contribuição, porém possuem um perfil total de resíduos que não alcança uma  $\Delta H$  total favorável, segundo os critérios da nossa classificação. A Figura 11 mostra a decomposição de resíduos para o controle negativo, 4N1Y (A) e um candidato pouco favorável, CgNR1P5 (B), demonstrando esse padrão geral observado.

Figura 10. Gráficos da contribuição dos resíduos para a energia livre de ligação proveniente da análise de decomposição de resíduos. À direita da linha tracejada no gráfico estão os resíduos localizados em H11. (A) Decomposição de resíduos da estrutura de controle positivo, 1GWR, que possui resíduos que alcançam  $-1.0$  kcal/mol de contribuição. Os resíduos Glu47, Arg88 e His215 do gráfico correspondem a Glu353, Arg394 e His524 do ER humano, resíduos que fazem interações polares com E2. (B) Gráfico da decomposição dos resíduos de CgNR0B, RN classificado como muito favorável à ligação com estradiol. Em nossas simulações, esse RN possui seis resíduos contribuindo para a diminuição da energia livre de ligação do complexo, com valores de contribuição que alcançam  $-2.35$  kcal/mol.

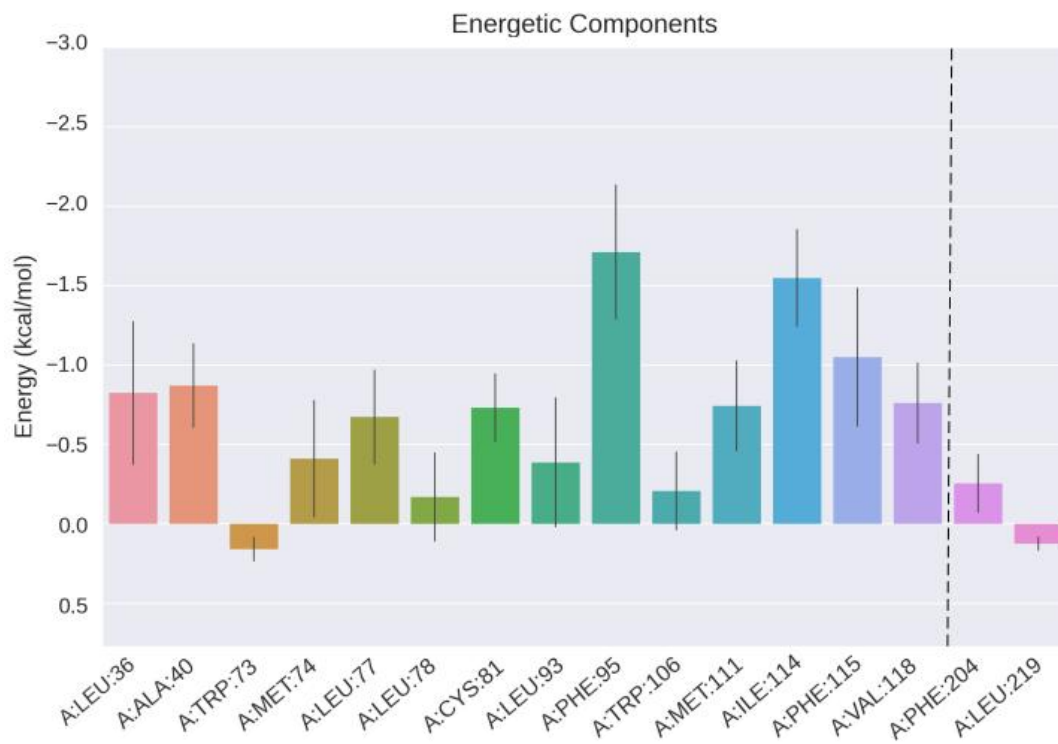


Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados de decomposição de resíduos obtidos pelo pacote gmx\_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et. al., 2021).

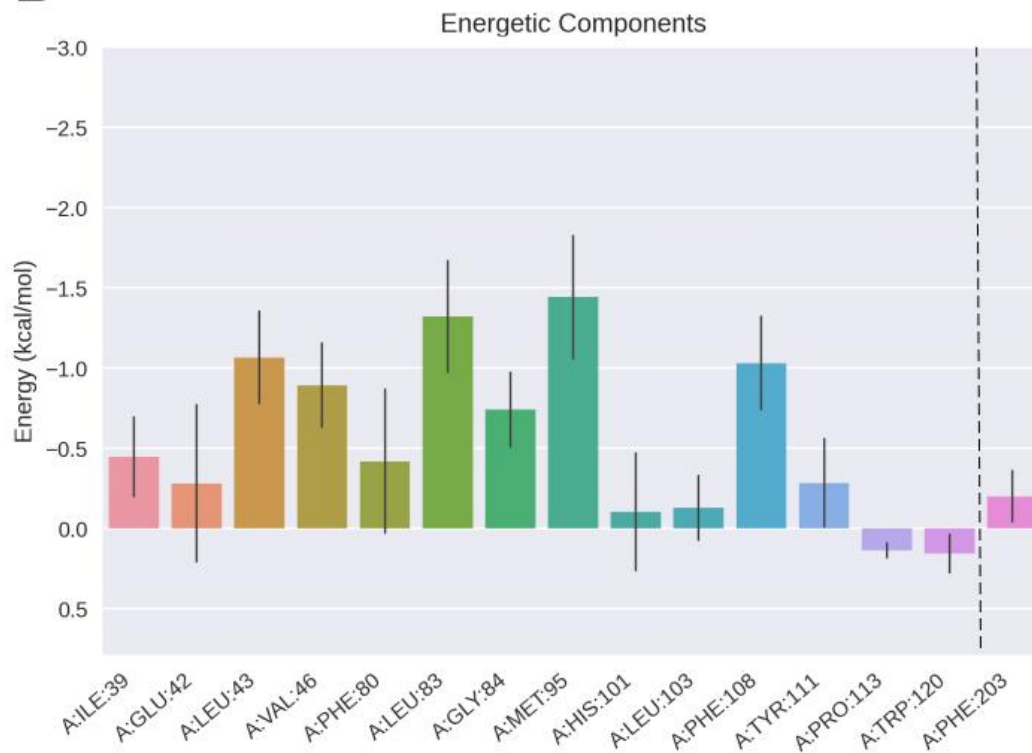


Figura 11. Gráficos da contribuição dos resíduos para a energia livre de ligação proveniente da análise de decomposição de resíduos. À direita da linha tracejada no gráfico estão os resíduos localizados em H11. (A) Decomposição de resíduos da estrutura de controle negativo, 4N1Y, contando com dois resíduos em H11 que não alcançam  $-0.5$  kcal/mol de contribuição. (B) Contribuição dos resíduos do modelo classificado como pouco favorável à interação com estradiol CgNR1P5. Este possui apenas um resíduo em H11 e, assim como o controle negativo, não alcança  $-0.5$  kcal/mol de contribuição.

A



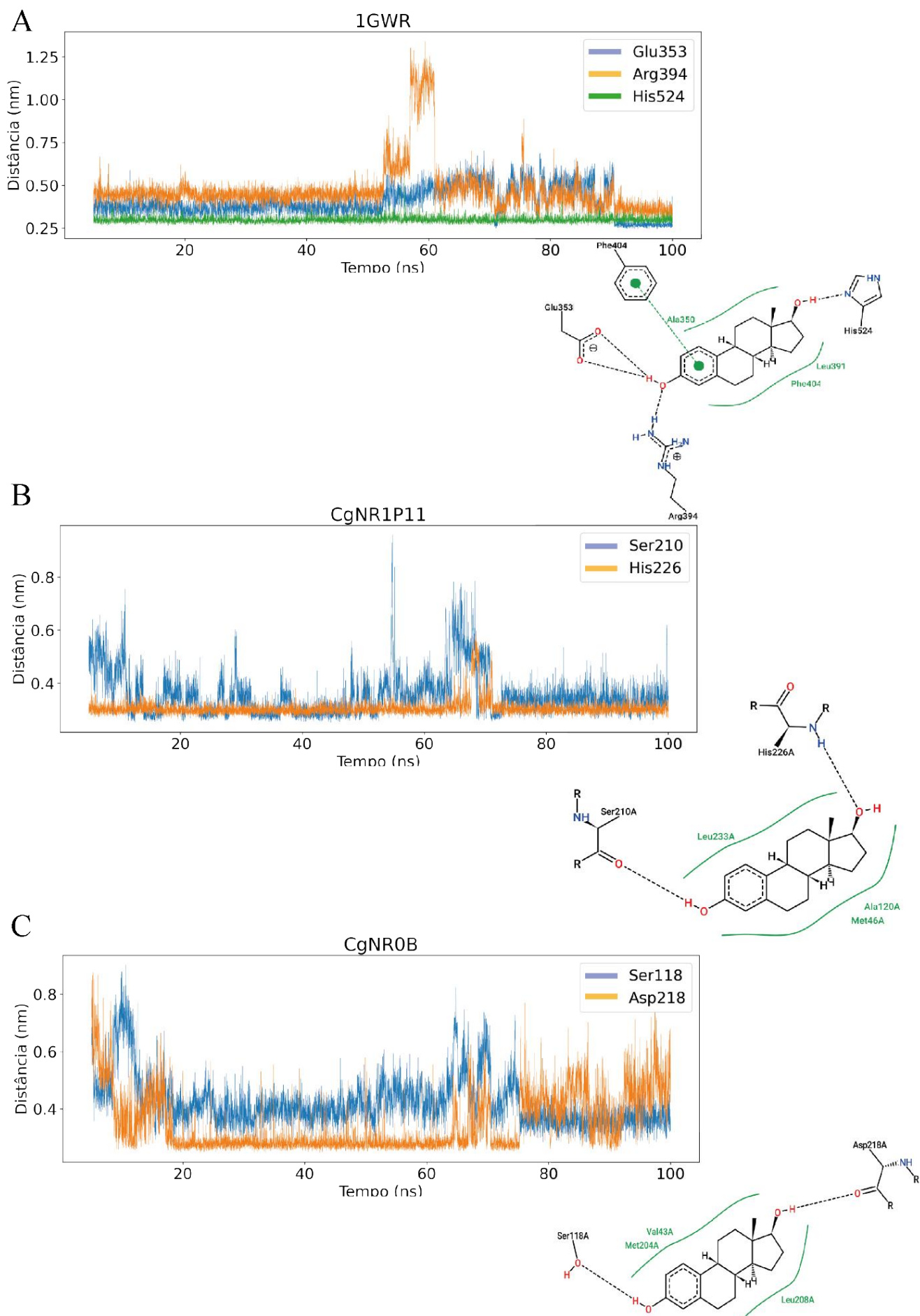
B



Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados de decomposição de resíduos obtidos pelo pacote gmx\_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et. al., 2021).

A presença de interações não-covalentes entre o ligante e resíduos do sítio de ligação é reconhecidamente imprescindível para a formação de um complexo proteína-ligante estável. A formação de interações fracas é acompanhada pela liberação de uma pequena quantidade de energia livre que estabiliza essa interação (NELSON; COX, 2014). A ligação específica do estradiol ao sítio de ligação do RE humano, por exemplo, ocorre através de uma combinação de ligações de hidrogênio, que demonstram protagonismo no ancoramento do ligante e manutenção da estabilidade do complexo na estrutura controle (CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007; SUMBAYEV et. al., 2005). Dessa forma, realizamos a análise das ligações de hidrogênio encontradas nos candidatos muito favoráveis à interação com a molécula alvo em nossa abordagem. Para identificar os resíduos que participam de ligações de hidrogênio, extraímos *snapshots* em formato .pdb dos 20 ns finais das trajetórias de simulação, os quais foram submetidos aos programas PoseView (STIERAND; RAREY, 2010) e LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995), para obter o perfil de interações encontradas sítio de ligação dos complexos. Posteriormente, utilizamos o módulo “*gmx distance*” do programa GROMACS (ABRAHAM et. al., 2015) para gerar gráficos da distância entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio ao longo dos 100 ns de simulação. Consideramos como ligações de hidrogênio as ligações que obtivessem distância entre o doador e acceptor de elétrons menor que 4 Å. As ligações de hidrogênio encontradas para o controle positivo 1GWR e para os candidatos muito favoráveis CgNR1P11 e CgNR0B estão demonstradas na Figura 12. As ligações de hidrogênio encontradas na simulação dos demais candidatos muito favoráveis estão apresentadas no APÊNDICE D (Figuras 27-28).

Figura 12. Ligações de hidrogênio encontradas para os complexos receptor-ligante dos candidatos muito favoráveis à ligação com estradiol CgNR1P11, CgNR0B e para a estrutura controle 1GWR. Para cada receptor, está demonstrado um gráfico da distância entre o átomo doador e acceptor de elétrons ao longo dos 100 ns de simulação e um diagrama bidimensional indicando as interações químicas entre os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação e o ligante. Linhas tracejadas pretas indicam ligações de hidrogênio, linhas sólidas verdes indicam interações hidrofóbicas e linhas tracejadas verdes indicam interações  $\pi$ - $\pi$ . Perfil de interações encontradas para 1GWR (A), CgNR1P11 (B) e CgNR2E2 (C).



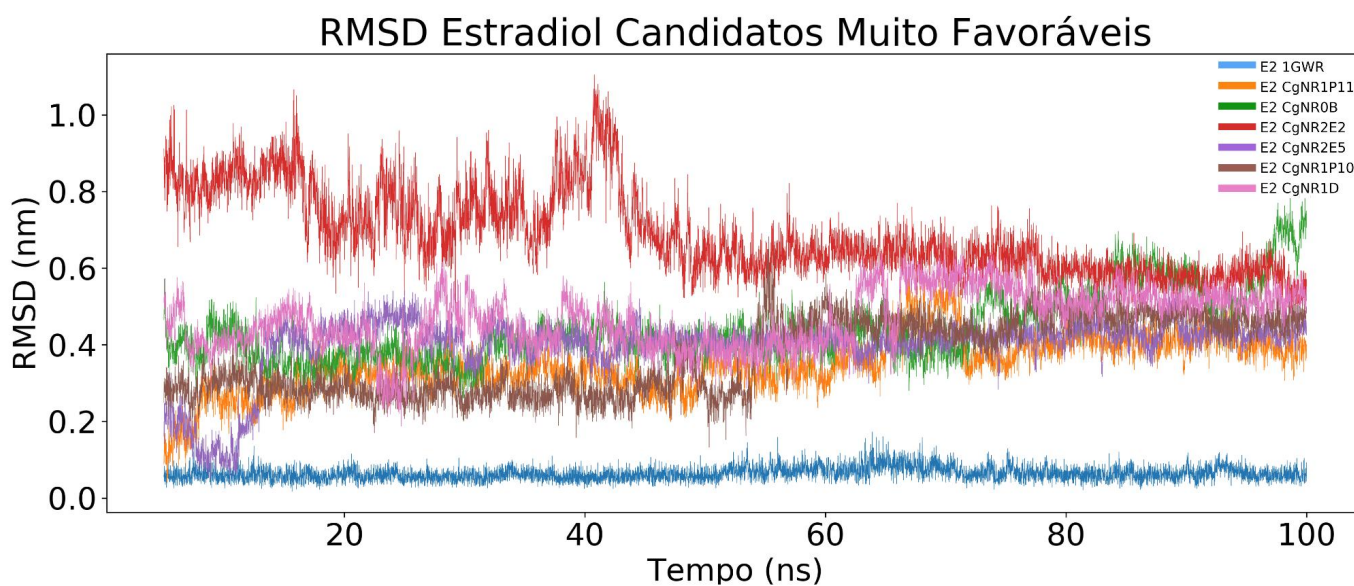
Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados obtidos nos programas PoseView (STIERAND; RAREY, 2010) e LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) e no módulo hbond do programa GROMACS (ABRAHAM et. al., 2015).

O perfil de ligações de hidrogênio encontrado reforça a contribuição destacada de resíduos localizados em H11 para os complexos receptor-ligante dos candidatos muito favoráveis de ligação ao estradiol. Assim como o esperado para o RE humano, nas simulações do complexo da estrutura experimental 1GWR foram mapeadas ligações de hidrogênio com os resíduos Glu353, Arg394 e His524. A ligação de hidrogênio do RE humano que apresentou menor distância entre doador e aceptor de elétrons e esteve presente ininterruptamente nos 100 ns de simulação foi a de His524, em H11 (Figura 12). CgNR1P11 apresentou ligação de hidrogênio com dois resíduos em H11, Ser210 e His226. A ligação com Ser210 possui flutuações, já a com His226 se mantém a uma distância que configura ligação de hidrogênio durante os 20 ns finais e por boa parte de toda a simulação. CgNR0B também apresentou ligação de hidrogênio com um resíduo em H11, Asp218. A ligação possui flutuações, porém apresenta distância compatível com ligação de hidrogênio ao longo da maior parte da simulação. Assim como demonstrado no APÊNDICE D, os outros quatro candidatos muito favoráveis à ligação com estradiol CgNR2E2, CgNR1D, CgNR1P10 e CgNR2E5 também apresentam ligação de hidrogênio entre o ligante e resíduos localizados em H11. O padrão observado em nossas análises da presença e contribuição de resíduos localizados em H11 para a manutenção de uma ligação mais favorável com estradiol está de acordo com diversos estudos que demonstram o protagonismo dos resíduos nesta hélice do LBD para interação com essa molécula (DANIELIAN et. al., 1993; CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007; SUMBAYEV et. al., 2005), fornecendo mais segurança ao apontarmos estes candidatos de ligação muito favorável com este ligante.

Uma vez que trabalhamos com modelos teóricos e com complexos receptor-ligante, da mesma forma, obtidos por ensaios teóricos, esperávamos encontrar uma variação maior na movimentação dos complexos dos modelos, quando comparado com a estrutura experimental de controle, como de fato foi observado. A seleção conformacional agonista do ER humano simulado em nosso trabalho, propiciada pela presença do estradiol no sítio de ligação, promove grande estabilidade ao complexo (CELIK; LUND; SCHIØTT, 2007; LI et. al., 2015). Em nossas simulações, a variação na posição da molécula de estradiol no sítio de

ligação do RE humano é mínima, com valor em torno de 1,2 Å. Por outro lado, nos modelos de RNs de *C. gigas* há grande variabilidade de volume e microambiente químico conferido pelos resíduos que formam o sítio de ligação dos 23 RNs da ostra do Pacífico simulados em nossa análise. A heterogeneidade intrínseca às características de LBDs de RNs de distintas subfamílias e grupos de RNs se traduz em uma variação muito maior na movimentação e acomodação do ligante no sítio de ligação. Como observado na Figura 13, o estradiol possui maior variação de sua posição no sítio de ligação dos modelos quando comparado à estrutura experimental controle. As maiores variações, considerando os 100 ns, ocorreram para os RNs CgNR0B (5.0 Å), CgNR1P10 (7.0 Å) e CgNR2E2 (6.0 Å). No entanto, é possível observar uma acomodação do ligante e maior estabilidade na posição deste nos 20 ns finais da simulação para os candidatos muito favoráveis mostrados na Figura 13. A variação na posição do estradiol, após 80 ns de simulação, é de no máximo 2 Å para todos os candidatos demonstrados, exceto CgNR0B, exceção que possui variação de 4 Å.

Figura 13. Gráfico do Desvio Médio Quadrático (RMSD) da posição do ligante 17- $\beta$ -estradiol no sítio de ligação dos receptores nucleares candidatos muito favoráveis à ligação com esta molécula e na estrutura experimental controle 1GWR. A variação da posição do ligante na estrutura controle é mínima e é possível observar a acomodação do ligante e maior estabilidade na posição deste nos 20 ns finais da simulação para os candidatos muito favoráveis.



Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados obtidos pelo módulo gmx rms do GROMACS (ABRAHAM et. al., 2015).

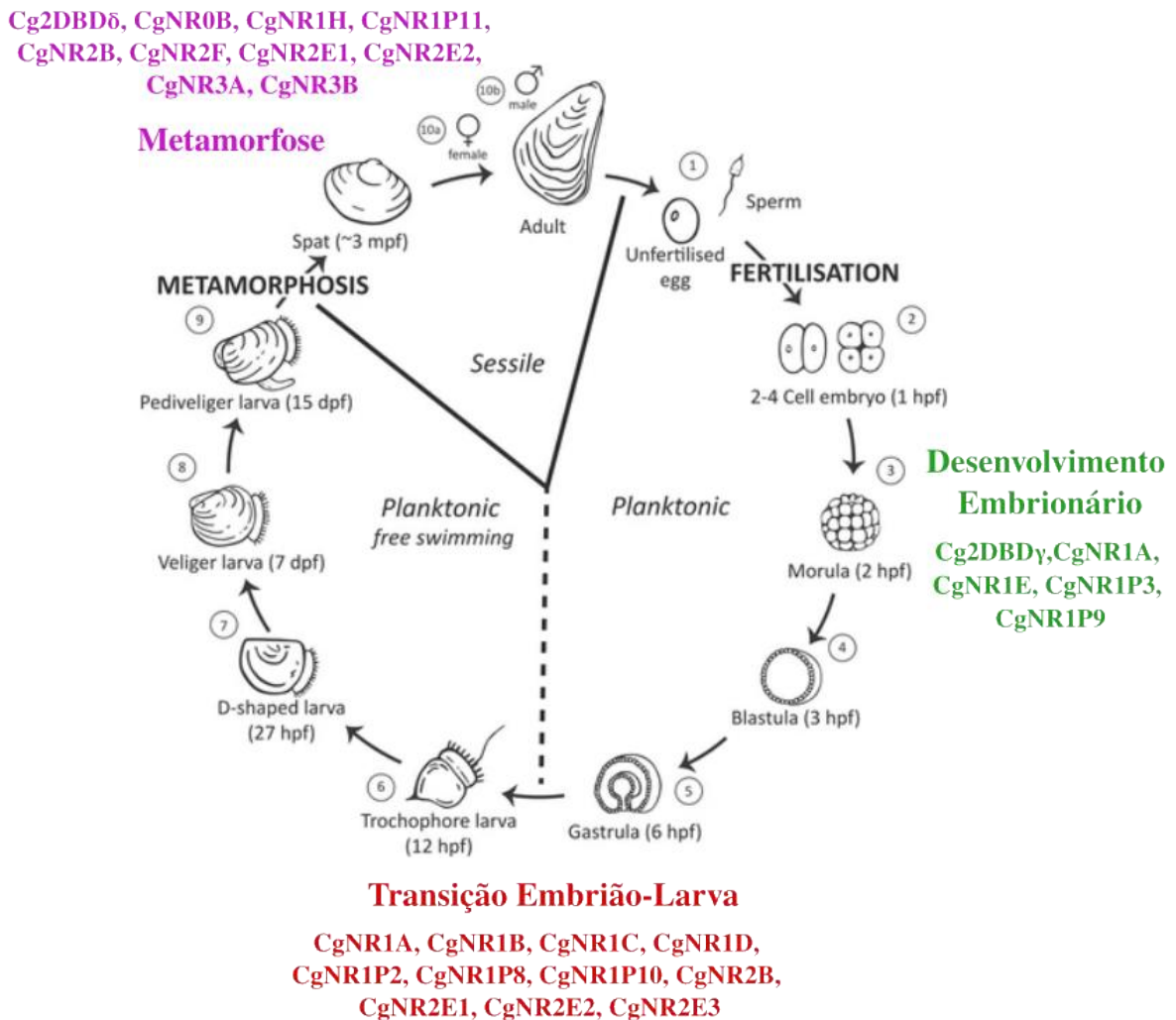
#### 4.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PAPEL FUNCIONAL DOS CANDIDATOS MUITO FAVORÁVEIS À LIGAÇÃO COM ESTRADIOL.

A publicação do genoma da ostra do Pacífico possibilitou a realização de diversos estudos que contribuem para uma melhor compreensão da biologia da espécie (ZHANG et. al., 2012). Um desses estudos, o de Vogeler e colaboradores (2014), utilizou uma combinação de análises filogenéticas e de bioinformática para estabelecer as relações filogenéticas da superfamília de RNs de *C. gigas*. Esse trabalho abriu caminhos para inferir a função, aspectos evolutivos e o potencial de interação dos RNs da espécie com ligantes, inclusive xenobióticos. Os RNs da ostra são categorizados em seis subfamílias (NR0-NR5). Todos os representantes da superfamília de RNs da espécie compõem a Tabela 1, com as respectivas relações de homologia com vertebrados e invertebrados (VOGELER et. al., 2014).

Em nossa análise, estudamos o domínio LBD de 41 RNs da ostra do Pacífico. Realizamos a modelagem de representantes de todas as subfamílias em que foram classificados os RNs da espécie. O potencial de interação dos modelos com a molécula xenobiótica de interesse foi testado através de duas metodologias, *docking* e DM, o que permitiu uma classificação, entre toda a superfamília, de alvos mais favoráveis à interação com o estradiol. Dentre os candidatos muito favoráveis citados em nossa análise dos resultados, encontram-se membros de três subfamílias de RNs, NR0, NR1 e NR2. As características funcionais e relações filogenéticas já conhecidas dessas subfamílias serão discutidas a seguir.

A ostra do Pacífico, assim como outras espécies de animais, possui regulação mediada por RNs nas fases de seu desenvolvimento (VOGELER et. al., 2016). Estudos do perfil de expressão de RNs em diferentes estágios do desenvolvimento da ostra demonstram a contribuição de diversos receptores (MIGLIOLI et. al., 2021; VOGELER et. al., 2016), inclusive os candidatos muito favoráveis à ligação com E2 em nossa análise. A Figura 14 mostra as fases do desenvolvimento de *C. gigas*, incluindo o desenvolvimento embrionário, a transição entre o embrião e o estágio de larva e a metamorfose, destacando RNs expressos diferencialmente em cada fase.

Figura 14. Expressão de RNs de *C. gigas* em diferentes fases do desenvolvimento. Receptores expressos durante o Desenvolvimento Embrionário estão representados em verde; na transição entre Embrião-Larva estão representados em vermelho; e na Metamorfose em roxo.



Fonte: Adaptada de Miglioli et. al. (2021) e de Vogeler et. al. (2016). Os dados para a construção da figura foram obtidos de Vogeler et al. (2016) e Huang et al. (2015; 2020).

Durante o desenvolvimento embrionário de invertebrados marinhos, como a ostra do Pacífico, ocorre, principalmente, a proliferação celular e a especificação de folhetos germinativos (VOGELER et. al., 2016). Na fase de transição entre embrião-larva, uma série de modificações e processos morfogenéticos resulta na formação da larva. Esses processos incluem padronização axial e corporal, iniciação da neurogênese e da organogênese (MIGLIOLI et. al., 2021). No desenvolvimento larval, estruturas para alimentação, sensibilidade à luz e natação são formadas. No entanto, a maioria dessas estruturas



posteriormente serão perdidas na fase de metamorfose, em que ocorrem modificações resultando no surgimento do plano corporal adulto (BRUSCA, MOORE, SHUSTER, 2018).

A subfamília NR1 de RNs possui muitos membros envolvidos no crescimento e desenvolvimento em humanos e em processos de muda e metamorfose em *Drosophila* (VOGELER et. al., 2014). Em vertebrados, RNs ativados por ligantes são encontrados principalmente nas subfamílias NR1 e NR3, e seus ligantes endógenos compreendem uma gama diversificada de compostos bioativos (MIGLIOLI et. al., 2021). O membro CgNR1D da ostra, candidato muito favorável à interação com E2, possui homologia com o receptor E75 da mosca da fruta e com o receptor Rev-Erb humano (VOGELER et. al., 2014). O gene para o receptor E75 é responsivo aos níveis de ecdisona, participando das vias reguladas por esse hormônio em uma variedade de tecidos e estágios do desenvolvimento (KING-JONES; THUMMEL, 2005). Mutantes que não produzem nenhuma isoforma de E75 tiveram interrupção durante a metade da ovogênese, indicando papéis essenciais desse receptor na fertilidade de fêmeas em *D. melanogaster* (BUSZCZAK et. al., 1999). Já Rev-Erb é um silenciador transcricional sem ligante identificado e possui funções semelhantes aos PPARs (Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma), com papéis importantes no metabolismo de lipídios e glicose e também no ritmo circadiano (RAMAKRISHNAN & MUSCAT, 2006). No caso da ostra, assim como em homólogos em outras espécies, CgNR1D encontra-se altamente expresso durante o desenvolvimento, principalmente no período de transição entre embrião-larva (Figura 14). Em um cenário de conservação da função de NR1D entre invertebrados, a disrupção do funcionamento deste receptor poderia ocasionar prejuízos na fertilidade de fêmeas, como ocorre em *Drosophila*.

Para os membros no novo grupo monofilético da subfamília NR1 de *C. gigas*, NR1P, as funções dos RNs inferidas com base em relações filogenéticas são limitadas, pois nenhum homólogo próximo foi identificado. Os RNs CgNR1P10 e CgNR1P11 da ostra apresentaram homologia com o grupo NR2E, na análise de Vogeler e colaboradores (2014). Coincidentemente, ambos os grupos foram classificados como candidatos muito favoráveis em nossa análise. Receptores do grupo NR1P apresentam variações em seu perfil de expressão em diferentes fases da vida da ostra, o que sugere que esses receptores cumprem distintas funções, apesar de serem muito próximos filogeneticamente (VOGELER et. al., 2016). Como exemplo, os RNs CgNR1P10 e CgNR1P11 demonstraram expressão diferencial nos tecidos da ostra nas fases de transição entre embrião-larva e metamorfose, respectivamente (Figura 14). Os resultados de ligação muito favorável de membros do novo grupo de *C. gigas* com esteróides como o estradiol, sugerem um perfil de parceiros prováveis

de ligação para o grupo NR1P, além de contribuir com informações novas acerca da estrutura e modos de ligação desse grupo de funcionalidade desconhecida.

A subfamília NR2 surgiu na base da linhagem de RNs em animais, contando com um representante no filo primitivo de invertebrados Placozoa, que surgiu após Porifera, mas antes de Cnidaria (MIGLIOLI et. al., 2021). Os membros da subfamília NR2 atuam durante o desenvolvimento de invertebrados marinhos, como *C. gigas*, com a expressão dos receptores CgNR2A, homólogo a HNF4 (Fator Nuclear de Hepatócito 4), CgNR2B, homólogo a RXR, CgNR2E2, homólogo a TLL e CgNR2F, homólogo a COUP-TF (do inglês *Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*) (Figura 14). Dois candidatos muito favoráveis de ligação ao E2 são membros do grupo NR2E, que contém RNs exercendo funções relacionadas ao desenvolvimento do sistema nervoso, à visão e à embriogênese. Homólogos em animais modelo invertebrados incluem os RNs TLL (*Tailess*), DSF (*Dissatisfaction*), DHR51 e DHR83 em *D. melanogaster* e FAX-1 em *C. elegans* (VOGELER et. al, 2014). Em vertebrados, os homólogos conhecidos desse grupo são PNR (Receptor Nuclear Fotorreceptor Específico) e TLX (KING-JONES; THUMMEL, 2005; VOGELER et. al., 2014). Em vertebrados e na mosca da fruta, TLX/TLL são receptores órfãos envolvidos no desenvolvimento do olho e do prosencéfalo, bem como na padronização do eixo ântero posterior durante o desenvolvimento embrionário, sugerindo algum nível de conservação funcional entre vertebrados e invertebrados (KING-JONES; THUMMEL, 2005; MIGLIOLI et. al, 2021). Sua expressão é predominante em tecidos neurais, sendo associado com papéis na neurogênese e no desenvolvimento de órgãos fotorreceptores (VOGELER et. al., 2016). Em vertebrados, TLX demonstrou manter células tronco neurais em estado indiferenciado, corroborando com dados de que células cerebrais adultas que perdem a função exercida por TLX se tornam incapazes de se proliferar e auto-renovar (SHI et. al., 2004). Já o RN DSF da mosca da fruta também é expresso no sistema nervoso e mutações no gene para este RN afetam o comportamento sexual em ambos os sexos (KING-JONES; THUMMEL, 2005). Alterações no comportamento sexual envolvidas com este RN incluem resistência à cópula pelas fêmeas e corte bissexual por machos. Além disso, animais mutantes para o gene DSF possuem neurônios motores que inervam músculos abdominais, afetando tanto a eficiência da cópula em machos, quanto a desova nas fêmeas (FINLEY et. al., 1998).

O receptor TLX em humanos é descrito como um receptor órfão, sem ligante identificado (WANG; XIONG, 2016). TLX pertence a uma classe de RNs que não possuem a H1 e a H2 no LBD e, dessa forma, tem potencial para formar uma grande cavidade de ligação (BENOD et al., 2014). Benod e colaboradores (2014) testaram a interação do volumoso sítio

de ligação de TLX com diversos compostos a fim de verificar a possibilidade deste receptor ser modulado por algum ligante e verificaram a interação com, dentre outras moléculas, drorogesterona, uma progestina esteróide. O estudo sugere que outros esteróides tem possibilidade de ligação com TLX, pois o sítio de ligação deste RN apresenta potencial para ligação com moléculas de esqueleto esteroidal. Os modelos de receptores da subfamília NR2E da ostra do Pacífico também não apresentaram a formação de H2, possibilitando, assim como descrito para TLX humano, a formação de uma cavidade de ligação volumosa. Nossos resultados de ligação muito favorável com estradiol por membros da subfamília NR2E em *C. gigas*, estão de acordo com o sugerido por Benod e colaboradores (2014) para o TLX humano e a afinidade deste com ligantes de esqueleto esteroidal.

O homólogo de TLX na ostra do Pacífico, CgNR2E1, é altamente expresso em estágio de transição entre embrião e larva e na metamorfose (Figura 14), dando indícios de possíveis papéis funcionais nestas fases do desenvolvimento (MIGLIOLI et. al., 2021). Além disso, dados da comparação da expressão gênica entre machos e fêmeas da ostra do Pacífico, mostraram os RNs CgNR2E2, CgNR2E5, CgNR3A e CgNR3B diferencialmente expressos em estágios iniciais de gametogênese (VOGELER et. al, 2016). Uma vez que a ostra apresenta mudança de sexo e de padrões reprodutivos sazonais que são direta ou indiretamente regulados por RNs, assim como em outras espécies de invertebrados e vertebrados (CARMI; KOPCZYNSKI; MEYER, 1998; VOGELER et. al., 2016), CgNR2E2 e CgNR2E5, altamente expressos durante a gametogênese (VOGELER et. al, 2016), podem estar envolvidos em importantes fenômenos reprodutivos da espécie.

Em experimentos que avaliaram a expressão diferencial de transcritos em tecidos da ostra do Pacífico exposta ao fármaco Tamoxifeno, molécula que possui propriedades químicas e estruturais para ocupar o mesmo sítio de ligação da molécula de estradiol em humanos (LONARD; SMITH, 2002), o grupo de pesquisa do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) da UFSC encontrou respostas transcricionais de CgNR2E2 e CgNR2E5 (dados não publicados). Estes receptores responsivos à presença da molécula de tamoxifeno, a qual possui propriedades químicas semelhantes ao estradiol, são os mesmos que em nossas análises *in silico* demonstram ligação favorável com o estradiol, dando indícios de que estes RNs também podem ser responsivos ao estradiol.

A subfamília NR0 de RNs reúne representantes estruturalmente não convencionais, os quais não possuem o domínio DBD, que se liga diretamente a elementos de resposta no DNA (VOGELER et. al, 2014). Em vez disso, estes receptores adquiriram a capacidade de interagir

com outros RNs estruturalmente convencionais e, assim, modular sua atividade (EHRLUND & TREUTER, 2011). O receptor SHP, um dos representantes humanos da subfamília NR0B, possui atividade de repressão transcricional. A inibição desse receptor envolve a competição de ligação com moléculas coativadoras à região AF-2 do LBD e, diferente da heterodimerização do receptor RXR, NR0B pode interagir tanto com monômeros quanto com dímeros. (JOHANSSON et. al., 1999). Outro representante humano de NR0B, DAX-1, está envolvido em importantes funções na esteroidogênese e no desenvolvimento reprodutivo, atuando como um marcante repressor da transcrição de outros RNs, como RE (EHRLUND & TREUTER, 2011). O representante NR0B da ostra do Pacífico apresenta um perfil de expressão aumentado durante o estágio de metamorfose do desenvolvimento da espécie (Figura 14). O RE e ERR (Receptor Relacionado a Estrógeno) da ostra (CgNR3A e CgNR3B, respectivamente) também encontram-se em expressão aumentada nesse período do desenvolvimento. É possível sugerir que, assim como o homólogo vertebrado, CgNR0B da ostra atue como repressor transcricional de CgNR3A e CgNR3B, participando do controle do desenvolvimento reprodutivo da espécie. Uma desregulação do funcionamento deste RN pela interação com uma molécula xenobiótica, como estradiol, pode representar impactos no desenvolvimento de aspectos reprodutivos da espécie.

Ensaio funcionais demonstraram que REs de anelídeos, filo irmão dos moluscos, podem se ligar e ativar a transcrição em resposta a E2 e desreguladores endócrinos (KEAY & THORNTON, 2009) diferente do modo de ação do RE da maioria dos moluscos, inclusive de *C. gigas*, que ativam a transcrição do RE independente de ligante (BRIDGHAM et. al., 2014; MATSUMOTO et. al., 2007; THORNTON; NEED; CREWS, 2003). Teoriza-se que o RE de moluscos exerceu atividade constitutiva quando o “interruptor” alostérico do LBD estagnou-se na posição agonista (KEAY & THORNTON, 2009). Isso ocorreu devido à modificações nos resíduos da cavidade de ligação do RE da maioria dos moluscos, os quais possuem cadeias laterais volumosas, que obstruem o espaço que um ligante poderia ocupar (BRIDGHAM et. al., 2014). Já os receptores de vertebrados evoluíram com uma sutil remodelação dos resíduos na cavidade de ligação, com diferentes substituintes compondo a mesma estrutura, possibilitando o reconhecimento de esteróides (KEAY & THORNTON, 2009). Para além da história evolutiva dos REs, do “interruptor” alostérico que pode ter selecionado receptores constitutivamente ativados ou dependentes de ligantes, a superfamília de RNs da ostra do Pacífico apresenta grupos não descritos em outras espécies e mecanismos de regulação da transcrição que podem não ser o de ligação direta do RE ao estradiol, mas

uma contribuição indireta deste ligante, como a regulação de outros RNs que são parceiros de ligação de CgNR3A e CgNR3B, para a regulação de respostas mediadas por estes RNs.

Os RNs candidatos muito favoráveis à ligação com E2 CgNR1P10, CgNR0B e CgNR2E2, além de encontrarem-se diferencialmente expressos durante o desenvolvimento de *C. gigas*, também apresentam expressão diferencial em machos e fêmeas adultos (VOGELER et. al. 2016). A maioria dos indivíduos de ostras do Pacífico se desenvolve primeiro como machos e podem mudar de sexo para fêmea após alguns ciclos anuais (GUO et. al., 1998). Hipotetizamos se o contato do xenobiótico E2 com os tecidos da ostra e a posterior ligação deste hormônio com os RNs CgNR1P10, CgNR0B e CgNR2E2, pode ocasionar perturbações nos ciclos reprodutivos anuais e nas mudanças de sexo que ocorrem naturalmente na espécie. Este potencial efeito nos fenômenos reprodutivos em adultos apresenta potencial como um biomarcador da presença de E2 no ambiente.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Propomos em nossa abordagem a identificação de candidatos de ligação favorável ao xenobiótico estradiol dentre os representantes da superfamília de receptores nucleares da ostra do Pacífico, uma espécie importante no contexto ecotoxicológico. Como demonstrado em nossos resultados, as metodologias de bioinformática estrutural viabilizam o estudo, e dessa forma, a ampliação do conhecimento biológico acerca de organismos para os quais possuímos poucas informações, como invertebrados. Através da combinação de metodologias computacionais de alto desempenho, atingimos modelos da estrutura do domínio LBD de 70% dos receptores nucleares da espécie alvo, para o qual se conhece a estrutura experimental de apenas um LBD. Utilizando a técnica de atracamento molecular e simulações de dinâmica molecular, identificamos candidatos de possível modulação direta pelo hormônio estradiol em uma espécie de molusco bivalve. Os receptores nucleares potenciais alvos de modulação por E2, CgNR1P11, CgNR0B, CgNR2E2, CgNR2E5, CgNR1P10 e CgNR1D, demonstram alta expressão e, dessa forma, participação na regulação do desenvolvimento de *C. gigas*. Nossos resultados apresentam informações novas sobre a estrutura e a dinâmica de interação da superfamília de receptores nucleares da ostra do Pacífico com moléculas de esqueleto esteroideal. Possíveis implicações da desregulação mediada pela interação do E2 com CgNR0B, CgNR1P10 e CgNR2E2 podem influenciar aspectos reprodutivos de *C. gigas*, apresentando potencial como biomarcadores de contaminação. Esses resultados são importantes para a construção do conhecimento acerca de espécies de invertebrados no

contexto de toxicologia ambiental e apontam caminhos para estudos posteriores de investigação de alvos de modulação por esteróides em invertebrados. Nosso estudo, portanto, é um passo na direção da compreensão dos impactos de contaminantes sobre organismos de interesse ecotoxicológico expostos a poluentes.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, Mark James; MURTOLA, Teemu; SCHULZ, Roland; PÁLL, Szilárd; SMITH, Jeremy C.; HESS, Berk; LINDAHL, Erik. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **Software**, v. 1-2, p. 19-25, set. 2015.
- AGUIRRE-MARTÍNEZ, Gabriela V.; DELVALLS, Angel T.; MARTÍN-DÍAZ, M. Laura. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 120, p.142-154, out. 2015.
- ANDERSON, Robert J.; WENG, Zhiping; CAMPBELL, Robert K.; JIANG, Xuliang. Main-chain conformational tendencies of amino acids. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 60, n. 4, p. 679-689, jul. 2005.
- ANTIZAR-LADISLAO, Blanca. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. **Environment International**, v. 34, n. 2, p.292-308, fev. 2008.
- AVIOR, Yishai; BOMZE, David; RAMON, Ory; NAHMIAS, Yaakov. Flavonoids as dietary regulators of nuclear receptor activity. **Food & Function**, v. 4, n. 6, 2013.
- BAKER, Amelia H.; WATT, James; HUANG, Cassie K.; GERSTENFELD, Louis C.; SCHLEZINGER, Jennifer J.. Tributyltin Engages Multiple Nuclear Receptor Pathways and Suppresses Osteogenesis in Bone Marrow Multipotent Stromal Cells. **Chemical Research In Toxicology**, v. 28, n. 6, p. 1156-1166, maio 2015.
- BAKER, Michael E. Steroid receptors and vertebrate evolution. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 496, out. 2019.
- BARREIROS, Luisa; QUEIROZ, Joana F.; MAGALHÃES, Luís M.; SILVA, Adrián M.T.; SEGUNDO, Marcela A.. Analysis of 17- $\beta$ -estradiol and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 243-262, maio 2016.
- BENOD, Cindy; VILLAGOMEZ, Rosa; FILGUEIRA, Carly S.; HWANG, Peter K.; LEONARD, Paul G.; PONCET-MONTANGE, Guillaume; RAJAGOPALAN, Senapathy; FLETTERICK, Robert J.; GUSTAFSSON, Jan-Åke; WEBB, Paul. The Human Orphan Nuclear Receptor Tailless (TLX, NR2E1) Is Druggable. **Plos One**, v. 9, n. 6, jun. 2014.
- BOURGUET, William; RUFF, Marc; CHAMBON, Pierre; GRONEMEYER, Hinrich; MORAS, Dino. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 377-382, jun. 1995.
- BRIDGHAM, Jamie T.; EICK, Geeta N.; LARROUX, Claire; DESHPANDE, Kirti; HARMS, Michael J.; GAUTHIER, Marie E. A.; ORTLUND, Eric A.; DEGNAN, Bernard M.; THORNTON, Joseph W.. Protein Evolution by Molecular Tinkering: diversification of the nuclear receptor superfamily from a ligand-dependent ancestor. **Plos Biology**, v. 8, n. 10, out. 2010.

BRIDGHAM, Jamie T.; KEAY, June; ORTLUND, Eric A.; THORNTON, Joseph W.. Vestigialization of an Allosteric Switch: genetic and structural mechanisms for the evolution of constitutive activity in a steroid hormone receptor. **Plos Genetics**, v. 10, n. 1, jan. 2014.

BRUSCA, R.C.; MOORE, W; SHUSTER, S.M. **Invertebrados**. 3a edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 2018. 1010p.

BRZOZOWSKI, Andrzej M.; PIKE, Ashley C. W.; DAUTER, Zbigniew; HUBBARD, Roderick E.; BONN, Tomas; ENGSTRÖM, Owe; ÖHMAN, Lars; GREENE, Geoffrey L.; GUSTAFSSON, Jan-Åke; CARLQUIST, Mats. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 753-758, out. 1997.

BUSZCZAK, M.; FREEMAN, M.R.; CARLSON, J.R.; BENDER, M.; COOLEY, L.; SEGRAVES, W.A.. Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. **Development**, v. 126, n. 20, p. 4581-4589, out. 1999.

CAJARAVILLE, Miren P; BEBIANNO, Maria J; BLASCO, Julián; PORTE, Cinta; SARASQUETE, Carmen; VIARENGO, Aldo. 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.

CAMACHO, Christiam; COULOURIS, George; AVAGYAN, Vahram; MA, Ning; PAPADOPOULOS, Jason; BEALER, Kevin; MADDEN, Thomas L. BLAST+: architecture and applications. **Bmc Bioinformatics**, v. 10, n. 1, dez. 2009.

CARMI, Ilil; KOPCZYNSKI, Jennifer B.; MEYER, Barbara J. The nuclear hormone receptor SEX-1 is an X-chromosome signal that determines nematode sex. **Nature**, v. 396, n. 6707, p. 168-173, nov. 1998.

CELIK, Leyla; LUND, Julie Davey Dalsgaard; SCHIÖTT, Birgit. Conformational Dynamics of the Estrogen Receptor  $\alpha$ :  $\pi$  molecular dynamics simulations of the influence of binding site structure on protein dynamics. **Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1743-1758, jan. 2007.

COLLIN, H.; MEISTERTZHEIM, A.-L.; DAVID, E.; MORAGA, D.; BOUTET, I. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. **Journal Of Experimental Biology**, v. 213, n. 23, p. 4010-4017, nov. 2010.

COMBALBERT, Sarah; HERNANDEZ-RAQUET, Guillermina. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1671-1692, mar. 2010.

CROLL, Tristan I.; SAMMITO, Massimo D.; KRYSHTAFOVYCH, Andriy; READ, Randy J. Evaluation of template-based modeling in CASP13. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 87, n. 12, p. 1113-1127, ago. 2019.

DANIELIAN, P. S.; WHITE, R.; LEES, J. A.; PARKER, M. G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. **The Embo Journal**, v. 11, n. 3, p. 1025-1033, mar. 1992.



DEBLONDE, Tiphanie; COSSU-LEGUILLE, Carole; HARTEMANN, Philippe. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442-448, nov. 2011.

DHEILLY, Nolwenn M.; LELONG, Christophe; HUVET, Arnaud; KELLNER, Kristell; DUBOS, Marie-Pierre; RIVIERE, Guillaume; BOUDRY, Pierre; FAVREL, Pascal. Gametogenesis in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. **Plos One**, v. 7, n. 5, 9 maio 2012.

DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia; BOURGUIGNON, Jean-Pierre; GIUDICE, Linda C.; HAUSER, Russ; PRINS, Gail S.; SOTO, Ana M.; ZOELLER, R. Thomas; GORE, Andrea C.. Endocrine-Disrupting Chemicals: an endocrine society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293-342, jun. 2009.

DOSS, C. George Priya; CHAKRABORTY, Chiranjib; NARAYAN, Vaishnavi; KUMAR, D. Thirumal. Computational Approaches and Resources in Single Amino Acid Substitutions Analysis Toward Clinical Research. **Advances In Protein Chemistry And Structural Biology**, p. 365-423, 2014.

EHRLUND, Anna; TREUTER, Eckardt. Ligand-independent actions of the orphan receptors/corepressors DAX-1 and SHP in metabolism, reproduction and disease. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 130, n. 3-5, p. 169-179, jul. 2012.

EICK, Geeta N.; COLUCCI, Jennifer K.; HARMS, Michael J.; ORTLUND, Eric A.; THORNTON, Joseph W. Evolution of Minimal Specificity and Promiscuity in Steroid Hormone Receptors. **Plos Genetics**, v. 8, n. 11, nov. 2012.

EKENA, Kirk; WEIS, Karen E.; KATZENELLENBOGEN, John A.; KATZENELLENBOGEN, Benita S.. Identification of Amino Acids in the Hormone Binding Domain of the Human Estrogen Receptor Important in Estrogen Binding. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 271, n. 33, p. 20053-20059, ago. 1996.

FINLEY, Kim D; EDEEN, Philip T; FOSS, Margit; GROSS, Erin; GHBEISH, Nora; PALMER, Ruth H; TAYLOR, Barbara J; MCKEOWN, Michael. Dissatisfaction Encodes a Tailless-like Nuclear Receptor Expressed in a Subset of CNS Neurons Controlling *Drosophila* Sexual Behavior. **Neuron**, v. 21, n. 6, p. 1363-1374, dez. 1998.

FODOR, István; URBÁN, Péter; SCOTT, Alexander P.; PIRGER, Zsolt. 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, out. 2020.

FORD, Alex T.; LEBLANC, Gerald A. Endocrine Disruption in Invertebrates: a survey of research progress. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 21, p. 13365-13369, out. 2020.

GANESAN, Aravindhan; COOTE, Michelle L.; BARAKAT, Khaled. Molecular dynamics-driven drug discovery: leaping forward with confidence. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 249-269, fev. 2017.

GOSLING E. **Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture**. Reprint. Bodim: Blackwell Science; 2004. 443p.

GOULD, Janet C.; LEONARD, Linda S.; MANESS, Susan C.; WAGNER, Brandee L.; CONNER, Kevin; ZACHAREWSKI, Tim; SAFE, Steve; MCDONNELL, Donald P.; GAIDO, Kevin W.. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor  $\alpha$  in a distinct manner from estradiol. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 142, n. 1-2, p. 203-214, jul. 1998.

GUO, Ximing; HEDGECOCK, Dennis; HERSHBERGER, William K.; COOPER, Kenneth; ALLEN JUNIOR, Standish K. GENETIC DETERMINANTS OF PROTANDRIC SEX IN THE PACIFIC OYSTER, *CRASSOSTREA GIGASTHUNBERG*. **Evolution**, v. 52, n. 2, p. 394-402, abr. 1998.

HADDAD, Yazan; ADAM, Vojtech; HEGER, Zbynek. Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. **Plos Computational Biology**, v. 16, n. 4, abr. 2020.

HANWELL, Marcus D; CURTIS, Donald e; LONIE, David C; VANDERMEERSCH, Tim; ZUREK, Eva; HUTCHISON, Geoffrey R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal Of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, ago. 2012.

HERNANDO, M; MEZCUA, M; A FERNANDEZALBA,; BARCELO, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v. 69, n. 2, p. 334-342, abr. 2006.

HIGUERA-RUIZ, R.; ELORZA, J. Biometric, microstructural, and high-resolution trace element studies in *Crassostrea gigas* of Cantabria (Bay of Biscay, Spain): anthropogenic and seasonal influences. **Estuarine, Coastal And Shelf Science**, v. 82, n. 2, p. 201-213, abr. 2009.

HIGUERA-RUIZ, R.; ELORZA, J. Shell thickening and chambering in the oyster *Crassostrea gigas*: natural and anthropogenic influence of tributyltin contamination. **Environmental Technology**, v. 32, n. 6, p. 583-591, abr. 2011.

HUANG, Wen; WU, Qian; XU, Fei; LI, Li; LI, Juan; QUE, Huayong; ZHANG, Guofan. Functional characterization of retinoid X receptor with an emphasis on the mediation of organotin poisoning in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Gene**, v. 753, ago. 2020.

HUANG, Wen; XU, Fei; LI, Juan; LI, Li; QUE, Huayong; ZHANG, Guofan. Evolution of a novel nuclear receptor subfamily with emphasis on the member from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Gene**, v. 567, n. 2, p. 164-172, ago. 2015.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: visual molecular dynamics. **Journal Of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, fev. 1996.

IGARASHI, Marco Antonio. Aspectos do desenvolvimento tecnológico do cultivo de ostra no Sul do Brasil. **Revista Semiárido de Visu**, v. 8, n. 1, p. 28-44. 2018.

JANER, Gemma; PORTE, Cinta. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 1, p.145-160, jan. 2007.

JOHANSSON, Lotta; BÅVNER, Ann; THOMSEN, Jane S.; FÄRNEGÅRDH, Mathias; GUSTAFSSON, Jan-Åke; TREUTER, Eckardt. The Orphan Nuclear Receptor SHP Utilizes

Conserved LXXLL-Related Motifs for Interactions with Ligand-Activated Estrogen Receptors. **Molecular And Cellular Biology**, v. 20, n. 4, p. 1124-1133, fev. 2000.

JOHANSSON, Lotta; THOMSEN, Jane S.; DAMDIMOPOULOS, Anastasios E.; SPYROU, Giannis; GUSTAFSSON, Jan-Åke; TREUTER, Eckardt. The Orphan Nuclear Receptor SHP Inhibits Agonist-dependent Transcriptional Activity of Estrogen Receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . **Journal Of Biological Chemistry**, v. 274, n. 1, p. 345-353, jan. 1999.

JONES, David T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices 1 Edited by G. Von Heijne. **Journal Of Molecular Biology**, v. 292, n. 2, p. 195-202, set. 1999.

KAJIWARA, Masaaki; KURAKU, Shigehiro; KUROKAWA, Takako; KATO, Kenichi; TODA, Shingo; HIROSE, Hidenori; TAKAHASHI, Shigeru; SHIBATA, Yasuyuki; IGUCHI, Taisen; MATSUMOTO, Toshie. Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*. **General And Comparative Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 315-326, set. 2006.

KARIMULLINA, Elina; LI, Yangchun; GINJUPALLI, Gautam K.; BALDWIN, William S. *Daphnia* HR96 is a promiscuous xenobiotic and endobiotic nuclear receptor. **Aquatic Toxicology**, v. 116-117, p. 69-78, jul. 2012.

KEAY, June; BRIDGHAM, Jamie T.; THORNTON, Joseph W.. The Octopus vulgaris Estrogen Receptor Is a Constitutive Transcriptional Activator: evolutionary and functional implications. **Endocrinology**, v. 147, n. 8, p. 3861-3869, ago. 2006.

KEAY, June; THORNTON, Joseph W.. Hormone-Activated Estrogen Receptors in Annelid Invertebrates: implications for evolution and endocrine disruption. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1731-1738, abr. 2009.

KETATA, Imen; DENIER, Xavier; HAMZA-CHAFFAI, Amel; MINIER, Christophe. Endocrine-related reproductive effects in molluscs. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 3, p. 261-270, abr. 2008.

KING-JONES, Kirst; THUMMEL, Carl S. Nuclear receptors — a perspective from *Drosophila*. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 4, p.311-323, abr. 2005.

LAFONT, René. The Endocrinology of Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 9, n. 1/2, p. 41-57, 2000.

LI, Lanlan; WANG, Qianqian; ZHANG, Yan; NIU, Yuzhen; YAO, Xiaojun; LIU, Huanxiang. The Molecular Mechanism of Bisphenol A (BPA) as an Endocrine Disruptor by Interacting with Nuclear Receptors: insights from molecular dynamics (md) simulations. **Plos One**, v. 10, n. 3, mar. 2015.

LI, Yong; LAMBERT, Millard H; XU, H.eric. Activation of Nuclear Receptors. **Structure**, v. 11, n. 7, p.741-746, jul. 2003.

LONARD, David M.; SMITH, Carolyn L.. Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions. **Steroids**, v. 67, n. 1, p.15-24, jan. 2002.

MANGELSDORF, David J.; EVANS, Ronald M.. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 841-850, dez. 1995.

MANGELSDORF, David J.; THUMMEL, Carl; BEATO, Miguel; HERRLICH, Peter; SCHÜTZ, Günther; UMESONO, Kazuhiko; BLUMBERG, Bruce; KASTNER, Philippe; MARK, Manuel; CHAMBON, Pierre. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, dez. 1995.

MATSUMOTO, Toshie; NAKAMURA, Akifumi M.; MORI, Katsuyoshi; AKIYAMA, Itsuka; HIROSE, Hidenori; TAKAHASHI, Yuji. Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. **General And Comparative Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 195-201, abr. 2007.

MIGLIOLI, Angelica; CANESI, Laura; GOMES, Isa D. L.; SCHUBERT, Michael; DUMOLLARD, Rémi. Nuclear Receptors and Development of Marine Invertebrates. **Genes**, v. 12, n. 1, p. 83-1, jan. 2021.

MORAES, R.; CRAPEZ, M.; PFEIFFER, W.; FARINA, M.; BAINY, A.C.D.; TEIXEIRA, V. **Efeitos de poluentes em organismos marinhos**. São Paulo: Arte e Ciência Vilipress. 2001. 288p.

MORRIS, Anne Louise et al. Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 12, n. 4, p.345-364, abr. 1992.

MUHAMMED, Muhammed Tilahun; AKI-YALCIN, Esin. Homology modeling in drug discovery: overview, current applications, and future perspectives. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 1, p. 12-20, out. 2018.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

NI, Jianbin; ZENG, Zhen; KE, Caihuan. Sex steroid levels and expression patterns of estrogen receptor gene in the oyster *Crassostrea angulata* during reproductive cycle. **Aquaculture**, v. 376-379, p. 105-116, fev. 2013.

NICHOLSON, S.; LAM, P.K.s.. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: bivalvia). **Environment International**, v. 31, n. 1, p. 121-132, jan. 2005.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee (NRNC): A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. **Cell**, 1999, 97:161–163.

OMIECINSKI, C. J.; HEUVEL, J. P. Vanden; PERDEW, G. H.; PETERS, J. M.. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 1, p. 49-75, nov. 2010.

OKIMOTO, Noriaki; FUTATSUGI, Noriyuki; FUJI, Hideyoshi; SUENAGA, Atsushi; MORIMOTO, Gentaro; YANAI, Ryoko; OHNO, Yousuke; NARUMI, Tetsu; TAIJI, Makoto. High-Performance Drug Discovery: computational screening by combining docking and molecular dynamics simulations. **Plos Computational Biology**, v. 5, n. 10, out. 2009.

PARK, Choa; SONG, Heewon; CHOI, Junyeong; SIM, Seunghye; KOJIMA, Hiroyuki; PARK, Joonwoo; IIDA, Mitsuru; LEE, Youngjoo. The mixture effects of bisphenol derivatives on estrogen receptor and androgen receptor. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 114036-1, maio 2020.

PETTERSEN, Eric F.; GODDARD, Thomas D.; HUANG, Conrad C.; COUCH, Gregory S.; GREENBLATT, Daniel M.; MENG, Elaine C.; FERRIN, Thomas E.. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal Of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

RAMAKRISHNAN, Sathiya N.; MUSCAT, George E.O. The Orphan Rev-Erb Nuclear Receptors: a link between metabolism, circadian rhythm and inflammation?. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 4, n. 1, jan. 2006.

REITZEL, Adam M; TARRANT, Ann M. Nuclear receptor complement of the cnidarian *Nematostella vectensis*: phylogenetic relationships and developmental expression patterns. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, 2009.

ROSSATO, Martina. **Gastrópodes como bioindicadores da poluição por organoestânicos: possíveis fatores que influenciam na acumulação dos compostos e indução do imposex**. 2017. 129 p. Tese (Doutorado) - Curso de Oceanografia Química, Física e Geológica, Furg, Rio Grande, 2017.

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

SCHRÖDINGER, L. L. C. The PyMOL molecular graphics system, Version 2.3.3. 2019. URL: <https://pymol.org/>. (Acesso em: 03 de fevereiro de 2022)

SCOTT, Alexander 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, nov. 2012.

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

SHELMERDINE, Richard; MOUAT, Beth; SHUCKSMITH, Rachel. The most northerly record of feral Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in the British Isles. **Bioinvasions Records**, v. 6, n. 1, p. 57-60, 2017.

SHI, Yanhong; LIE, D. Chichung; TAUPIN, Philippe; NAKASHIMA, Kinichi; RAY, Jasodhara; YU, Ruth T.; GAGE, Fred H.; EVANS, Ronald M. Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. **Nature**, v. 427, n. 6969, p. 78-83, jan. 2004.

SIEVERS, Fabian; WILM, Andreas; DINEEN, David; GIBSON, Toby J; KARPLUS, Kevin; LI, Weizhong; LOPEZ, Rodrigo; MCWILLIAM, Hamish; REMMERT, Michael; SÖDING, Johannes. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, jan. 2011.

SILVA, Carla Patrícia; OTERO, Marta; ESTEVES, Valdemar. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 38-58, jun. 2012.

SLUDER, Ann .; MAINA, Claude V. Nuclear receptors in nematodes: themes and variations. **Trends In Genetics**, v. 17, n. 4, p.206-213, abr. 2001.

SOLÉ, Montserrat; BUET, Astrid; ORTIZ, Laura; MAYNOU, Francesc; BAYONA, Josep Maria; ALBAIGÉS, Joan. Bioaccumulation and biochemical responses in mussels exposed to the water-accommodated fraction of the Prestige fuel oil. **Sci. Mar.**, v. 71, p.373-382, 2007.

SOUZA, Paulo C. T.; ALESSANDRI, Riccardo; BARNOUD, Jonathan; THALLMAIR, Sebastian; FAUSTINO, Ignacio; GRÜNEWALD, Fabian; PATMANIDIS, Ilias; ABDIZADEH, Haleh; BRUININKS, Bart M. H.; WASSENAAR, Tsjerk A.. Martini 3: a general purpose force field for coarse-grained molecular dynamics. **Nature Methods**, v. 18, n. 4, p. 382-388, mar. 2021.

SOUZA, Paulo C. T.; THALLMAIR, Sebastian; CONFLITTI, Paolo; RAMÍREZ-PALACIOS, Carlos; ALESSANDRI, Riccardo; RANIOLO, Stefano; LIMONGELLI, Vittorio; MARRINK, Siewert J.. Protein–ligand binding with the coarse-grained Martini model. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, jul. 2020.

STEINMETZ, Anke C. U.; RENAUD, Jean-Paul; MORAS, Dino. Binding of Ligands and Activation of Transcription by Nuclear Receptors. **Annual Review Of Biophysics And Biomolecular Structure**, v. 30, n. 1, p. 329-359, jun. 2001.

STIERAND, Katrin; RAREY, Matthias. Drawing the PDB: Protein–Ligand Complexes in Two Dimensions. **Acs Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 9, p.540-545, ago. 2010.

SUMBAYEV, Vadim V.; BONEFELD-JØRGENSEN, Eva C.; WIND, Troels; ANDREASEN, Peter A.. A novel pesticide-induced conformational state of the oestrogen receptor ligand-binding domain, detected by conformation-specific peptide binding. **Febs Letters**, v. 579, n. 2, p. 541-548, dez. 2004.

TAO, Lian Jing; SEO, Dong Eun; JACKSON, Benjamin; IVANOVA, Natalia B.; SANTORI, Fabio Rinaldo. Nuclear Hormone Receptors and Their Ligands: metabolites in control of transcription. **Cells**, v. 9, n. 12, dez. 2020.

THORNTON, Joseph W.; NEED, Eleanor; CREWS, David. Resurrecting the Ancestral Steroid Receptor: ancient origin of estrogen signaling. **Science**, v. 301, n. 5640, p. 1714-1717, set. 2003.

TIMMINS-SCHIFFMAN, Emma; COFFEY, William D; HUA, Wilber; NUNN, Brook L; DICKINSON, Gary H; ROBERTS, Steven B. Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas*. **Bmc Genomics**, v. 15, n. 1, nov. 2014.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal Of Computational Chemistry**, p.455-461, jan. 2010.

VALDÉS-TRESANCO, Mario S.; VALDÉS-TRESANCO, Mario E.; VALIENTE, Pedro A.; MORENO, Ernesto. Gmx\_MMPBSA: a new tool to perform end-state free energy calculations with gromacs. **Journal Of Chemical Theory And Computation**, v. 17, n. 10, p. 6281-6291, set. 2021.

VANOMMESLAEGHE, K.; HATCHER, E.; ACHARYA, C.; KUNDU, S.; ZHONG, S.; SHIM, J.; DARIAN, E.; GUVENCH, O.; LOPES, P.; VOROBYOV, I. CHARMM general force field: a force field for drug-like molecules compatible with the charmm all-atom additive biological force fields. **Journal Of Computational Chemistry**, p. 1-1, 2009.

VERLI, Hugo. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - Sbbq, 2014. 282 p.

VOGELER, Susanne; BEAN, Tim P.; LYONS, Brett P.; GALLOWAY, Tamara S. Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development. **Bmc Developmental Biology**, v. 16, n. 1, set. 2016.

VOGELER, Susanne; GALLOWAY, Tamara S.; ISUPOV, Michail; BEAN, Tim P. Cloning retinoid and peroxisome proliferator-activated nuclear receptors of the Pacific oyster and in silico binding to environmental chemicals. **Plos One**, v. 12, n. 4, abr. 2017.

VOGELER, Susanne; GALLOWAY, Tamara s; LYONS, Brett P; BEAN, Tim P. The nuclear receptor gene family in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, contains a novel subfamily group. **Bmc Genomics**, v. 15, n. 1, maio 2014.

WALLACE, Andrew C.; LASKOWSKI, Roman A.; THORNTON, Janet M.. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, n. 2, p.127-134, 1995.

WANG, Tao; XIONG, Jian-qiong. The Orphan Nuclear Receptor TLX/NR2E1 in Neural Stem Cells and Diseases. **Neuroscience Bulletin**, v. 32, n. 1, p.108-114, jan. 2016.

WANG, Xiaotong; XU, Wenjie; WEI, Lei; ZHU, Chenglong; HE, Cheng; SONG, Hongce; CAI, Zhongqiang; YU, Wenchao; JIANG, Qiuyun; LI, Lingling. Nanopore Sequencing and De Novo Assembly of a Black-Shelled Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Genome. **Frontiers In Genetics**, v. 10, 22 nov. 2019. Frontiers Media SA.

WATERHOUSE, Andrew et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p.296-303, maio 2018. Oxford University Press (OUP).

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. , p. 407-410, maio 2007.

WURTZ, Jean-Marie; BOURGUET, William; RENAUD, Jean-Paul; VIVAT, Valérie; CHAMBON, Pierre; MORAS, Dino; GRONEMEYER, Hinrich. A canonical structure for the

ligand-binding domain of nuclear receptors. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 1, p. 87-94, jan. 1996.

ZACCHI, Flávia Lucena. **Respostas bioquímicas e moleculares em *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) coletadas em duas baías do Sul do Brasil**. 2013. 104 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

ZHANG, Guofan; FANG, Xiaodong; GUO, Ximing; LI, Li; LUO, Ruibang; XU, Fei; YANG, Pengcheng; ZHANG, Linlin; WANG, Xiaotong; QI, Haigang. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49-54, set. 2012.

ZHANG, Guofan; LI, Li; MENG, Jie; QI, Haigang; QU, Tao; XU, Fei; ZHANG, Linlin. Molecular Basis for Adaptation of Oysters to Stressful Marine Intertidal Environments. **Annual Review Of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 357-381, fev. 2016.

ZHANG, Yang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **Bmc Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p.9-40, jan. 2008.

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

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



## APÊNDICE A - Código de Acesso das Sequências de RNs

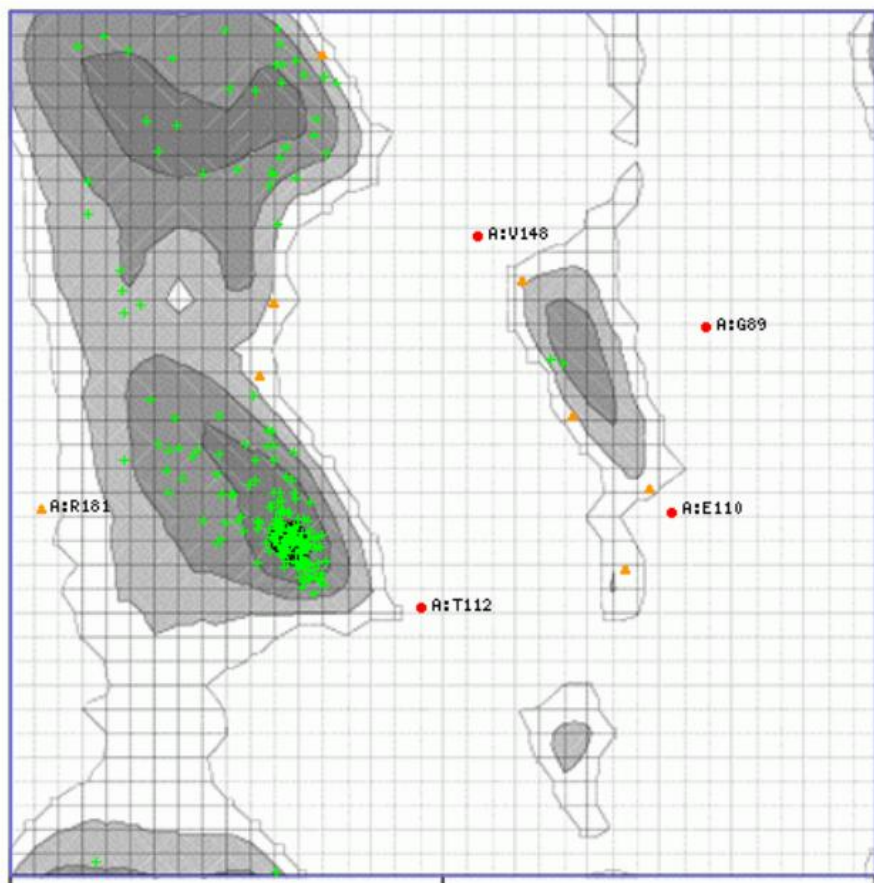
Tabela 5. Código de acesso do NCBI das sequências de receptores nucleares da ostra do Pacífico utilizadas no trabalho.

<b>Subfamília e Grupo do RN</b>	<b>Receptor Nuclear</b>	<b>Código de Acesso</b>
1A	CgNR1A	XP_011443300.1
1B	CgNR1B	ARM65370.1
1C	CgNR1C	XP_011412920.1
1D	CgNR1D	XP_034303845.1
	CgNR1CDEFa	XP_011446963.1
	CgNR1CDEFb	XP_011445718.1
1E	CgNR1E	XP_011419905.1
1F	CgNR1F	XP_011437283.1
1H	CgNR1H	XP_011416714.1
	CgNR1Ja	XP_011436006.1
	CgNR1Jb	XP_011428274.1
1J	CgNR1Jg	XP_011454352.1
	CgNR1P1	XP_011431574.1
	CgNR1P2	XP_011449920.1
	CgNR1P3	XP_011431575.1
	CgNR1P4	XP_011439771.1
	CgNR1P5	XP_011431105.1
	CgNR1P6	XP_011423680.1
	CgNR1P7	XP_011431570.1
	CgNR1P8	XP_011431576.1
	CgNR1P9	XP_019924080.1
	CgNR1P10	XP_011431624.1
CgNR1P11	XP_011431632.2	
2A	CgNR2A	XP_011451244.1
2B	CgNR2B	XP_011434498.1
2C	CgNR2CD	XP_011438114.1
	CgNR2E1	XP_011438581.1
2E	CgNR2E2	XP_011438583.1
	CgNR2E3	XP_011416690.1
	CgNR2E5	XP_011433241.1

2F	CgNR2F	XP_011456035.1
3A	CgNR3A	XP_011424805.1
3B	CgNR3B	XP_011414547.1
4A	CgNR4A	XP_011451639.1
5A	CgNR5A	XP_011438720.1
5B	CgNR5B	XP_011413194.1
0B	CgNR0B	XP_011442427.1
2DBDNR	Cg2DBD $\gamma$	XP_019919868.1
	Cg2DBD $\delta$	XP_011428801.1
Não atribuído	CgNHR42	XP_011436094.1
	CgNHR43	XP_019924290.1

## APÊNDICE B - Parâmetros de Qualidade dos Modelos

Figura 15. Gráfico de Ramachandran do modelo CgNR3A demonstrando que 94.64% dos resíduos do modelo se encontram em regiões altamente preferíveis, 3.57% dos resíduos se encontram em regiões preferíveis e 1.78% dos resíduos se encontram em regiões questionáveis.



The chart is color-coded for your convenience:

Black Dark Grey Grey Light Grey represent Highly Preferred Conformations.  $\Delta \geq -2$

White with **Black Grid** represents preferred conformations.  $-2 > \Delta \geq -4$

White with Grey Grid represents questionable conformations.  $\Delta < -4$

Highly Preferred observations shown as GREEN Crosses: 212 (94.643%)

Preferred observations shown as BROWN Triangles: 8 (3.571%)

Questionable observations shown as RED Circles: 4 (1.786%)

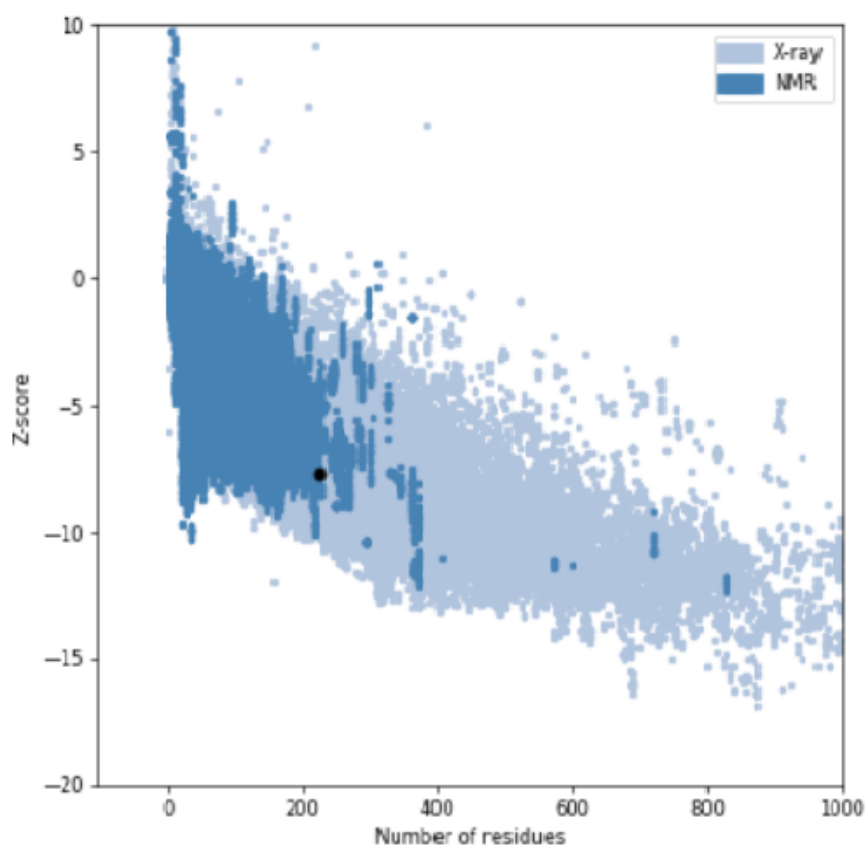
Not Shown: 2

Total: 224

Fonte: *Ramachandran Plot Server*, disponível em <https://zlab.umassmed.edu/bu/rama/>.

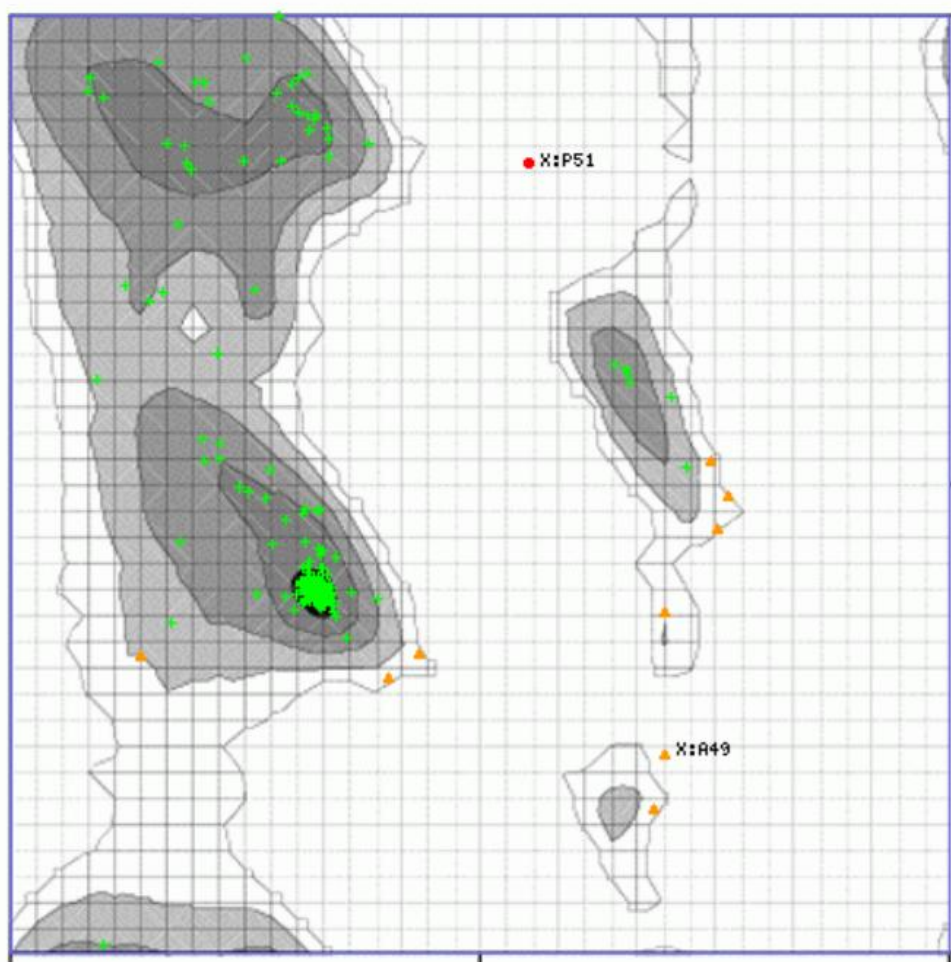
Figura 16. Diagrama demonstrando a pontuação *Z-score* para o modelo CgNR3A, o qual demonstra pontuação de qualidade para o modelo quando este é comparado a estruturas determinadas experimentalmente.

Z-Score: **-7.72**



Fonte: Programa ProSA-web, disponível em: <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>.

Figura 17. Gráfico de Ramachandran do modelo CgNR1D mostrando que 96.09% dos resíduos do modelo se encontram em regiões altamente preferíveis, 3.51% dos resíduos se encontram em regiões preferíveis e 0.39% dos resíduos se encontram em regiões questionáveis.



The chart is color-coded for your convenience:

**Black** **Dark Grey** **Grey** **Light Grey** represent Highly Preferred Conformations.  $\Delta \geq -2$

White with **Black Grid** represents preferred conformations.  $-2 > \Delta \geq -4$

White with Grey Grid represents questionable conformations.  $\Delta < -4$

Highly Preferred observations shown as GREEN Crosses: 246 (96.094%)

Preferred observations shown as BROWN Triangles: 9 (3.516%)

Questionable observations shown as RED Circles: 1 (0.391%)

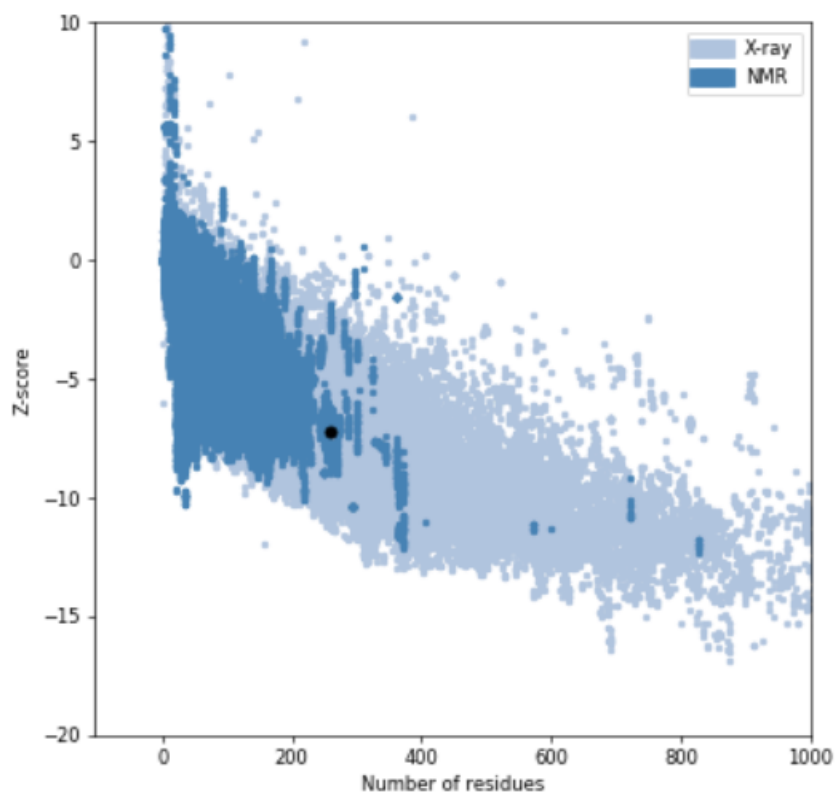
Not Shown: 2

Total: 256

Fonte: *Ramachandran Plot Server*, disponível em <https://zlab.umassmed.edu/bu/rama/>.

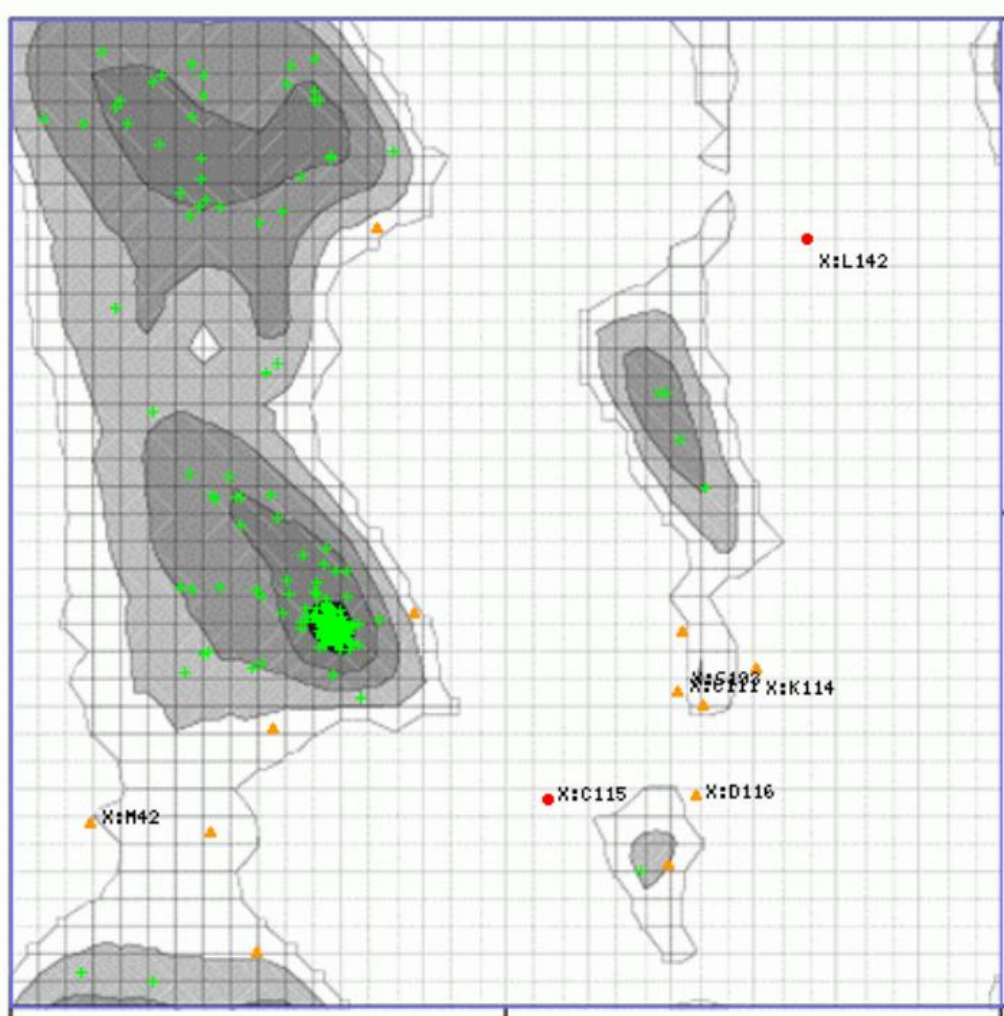
Figura 18. Diagrama demonstrando a pontuação *Z-score* para o modelo CgNR1D o qual demonstra pontuação de qualidade para o modelo quando este é comparado a estruturas determinadas experimentalmente.

Z-Score: **-7.22**



Fonte: Programa ProSA-web, disponível em: <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>.

Figura 19. Gráfico de Ramachandran do modelo CgNR1C demonstrando que 93.83% dos resíduos do modelo se encontram em regiões altamente preferíveis, 5.28% dos resíduos se encontram em regiões preferíveis e 0.88% dos resíduos se encontram em regiões questionáveis. Apesar de apresentar porcentagens de Ramachandran de uma estrutura proteica de alta qualidade, este modelo não apresentou todos os elementos de estrutura secundária que formam o sítio de ligação do LBD e por isso sua utilização foi descontinuada.



The chart is color-coded for your convenience:

**Black** **Dark Grey** **Grey** **Light Grey** represent Highly Preferred Conformations.  $\Delta \geq -2$

White with **Black Grid** represents preferred conformations.  $-2 > \Delta \geq -4$

White with Grey Grid represents questionable conformations.  $\Delta < -4$

Highly Preferred observations shown as GREEN Crosses: 213 (93.833%)

Preferred observations shown as BROWN Triangles: 12 (5.286%)

Questionable observations shown as RED Circles: 2 (0.881%)

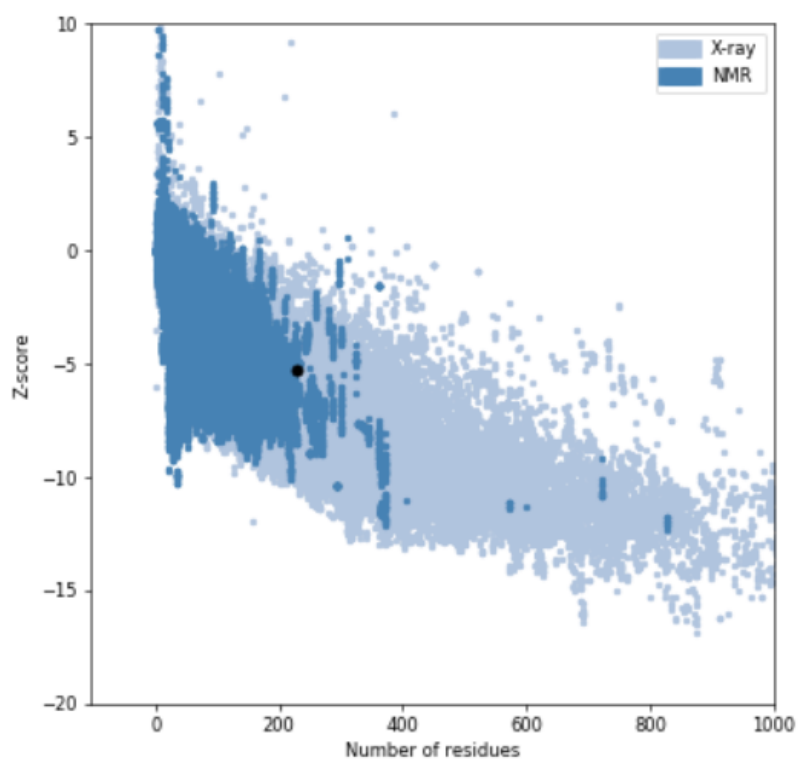
Not Shown: 2

Total: 227

Fonte: Ramachandran Plot Server, disponível em <https://zlab.umassmed.edu/bu/rama/>.

Figura 20. Diagrama demonstrando a pontuação *Z-score* para o modelo CgNR1C, o qual demonstra pontuação de qualidade para o modelo quando este é comparado a estruturas determinadas experimentalmente. Apesar da pontuação de qualidade, este modelo não apresentou todos os elementos de estrutura secundária que formam o sítio de ligação do LBD e por isso sua utilização foi descontinuada.

Z-Score: **-5.27**

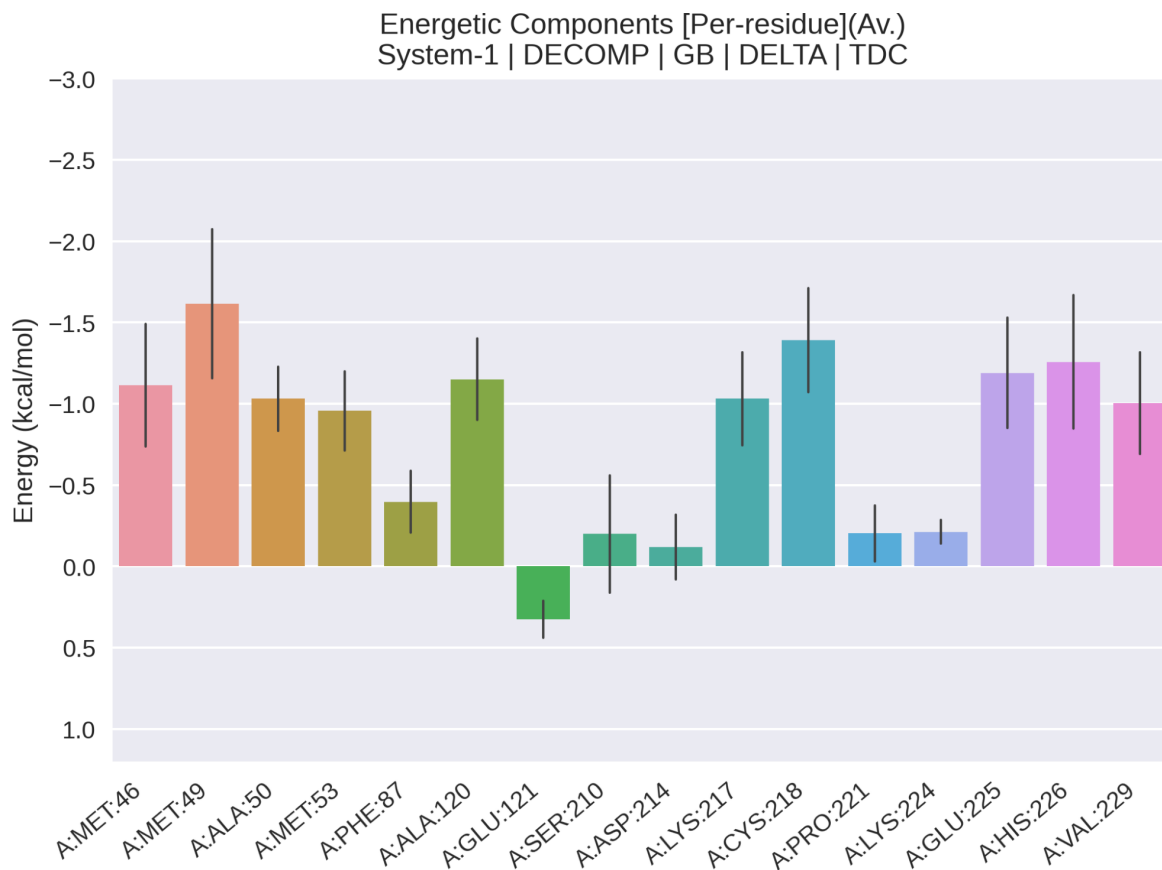


Fonte: Programa ProSA-web, disponível em: <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>.



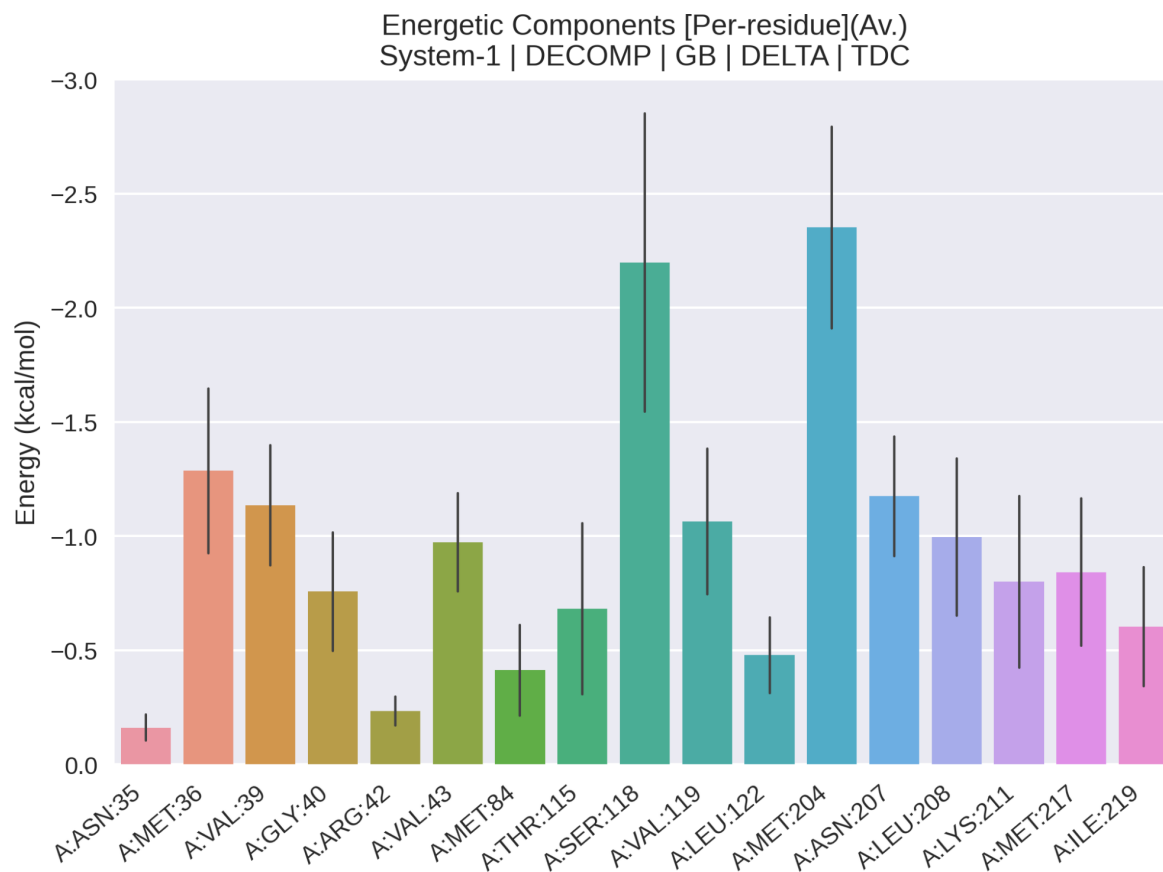
## APÊNDICE C - Análise da Decomposição de Resíduos

Figura 21. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR1P11.



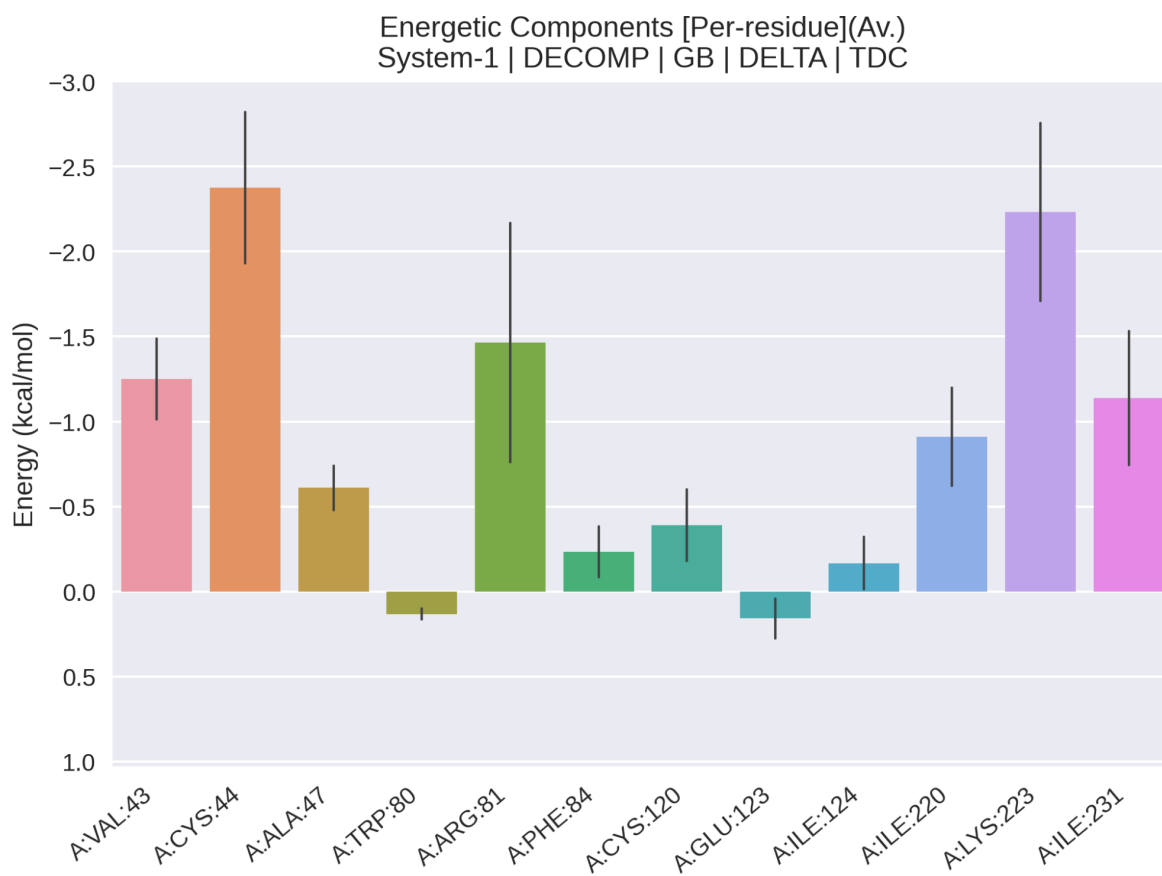
Fonte: Módulo gmx\_MMPBSA\_ana do pacote gmx\_MMPBSA, disponível em: [https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx\\_MMPBSA/](https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx_MMPBSA/).

Figura 22. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR0B.



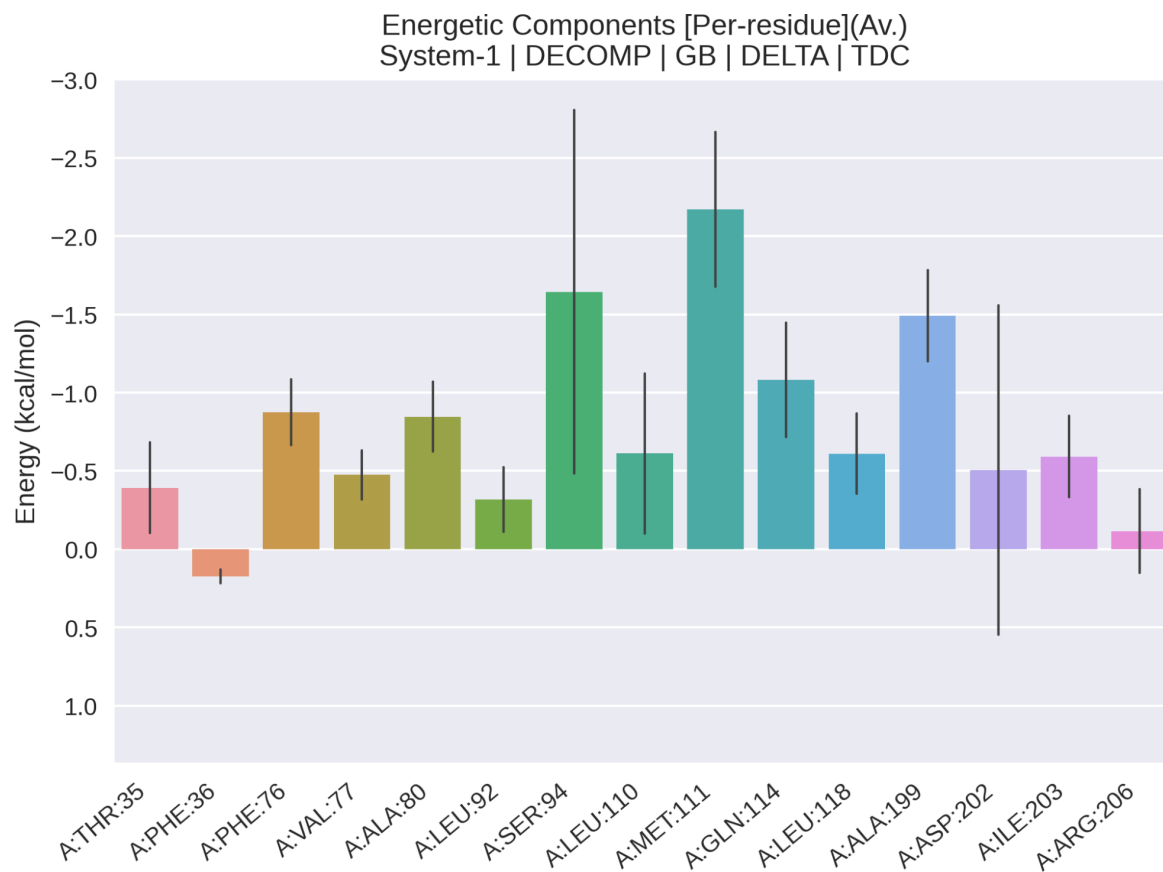
Fonte: Módulo gmx\_MMPBSA\_ana do pacote gmx\_MMPBSA, disponível em: [https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx\\_MMPBSA/](https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx_MMPBSA/).

Figura 23. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR2E2.



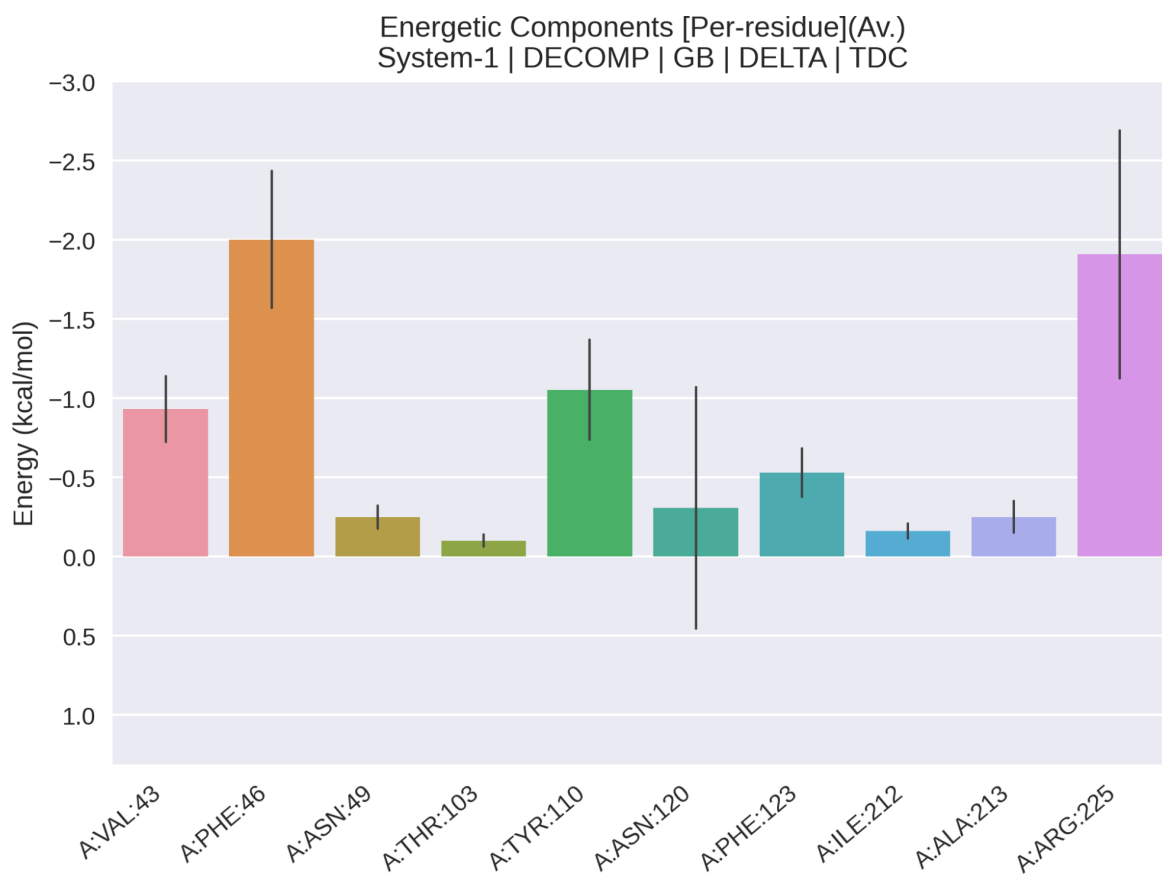
Fonte: Módulo `gmx_MMPBSA_ana` do pacote `gmx_MMPBSA`, disponível em: [https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx\\_MMPBSA/](https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx_MMPBSA/).

Figura 24. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR2E5.



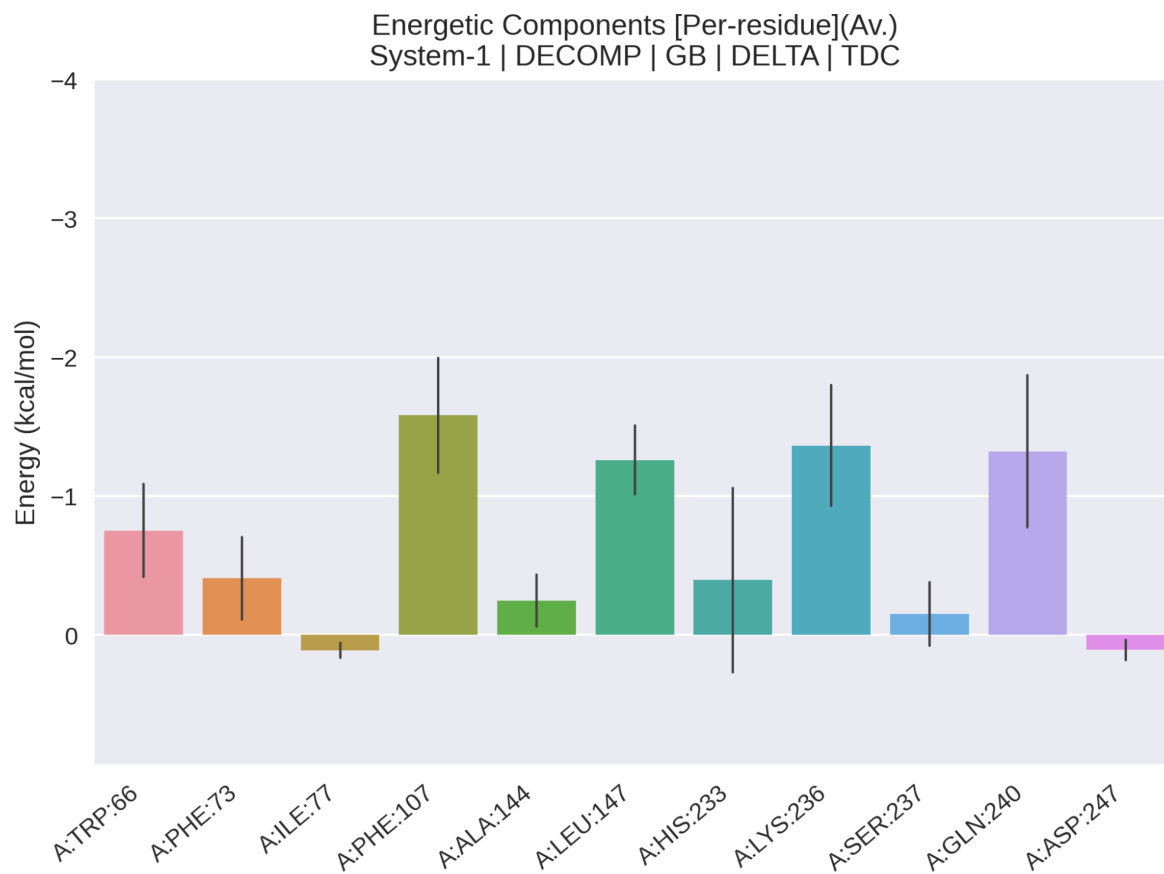
Fonte: Módulo gmx\_MMPBSA\_ana do pacote gmx\_MMPBSA, disponível em: [https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx\\_MMPBSA/](https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx_MMPBSA/).

Figura 25. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR1P10.



Fonte: Módulo gmx\_MMPBSA\_ana do pacote gmx\_MMPBSA, disponível em: [https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx\\_MMPBSA/](https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx_MMPBSA/).

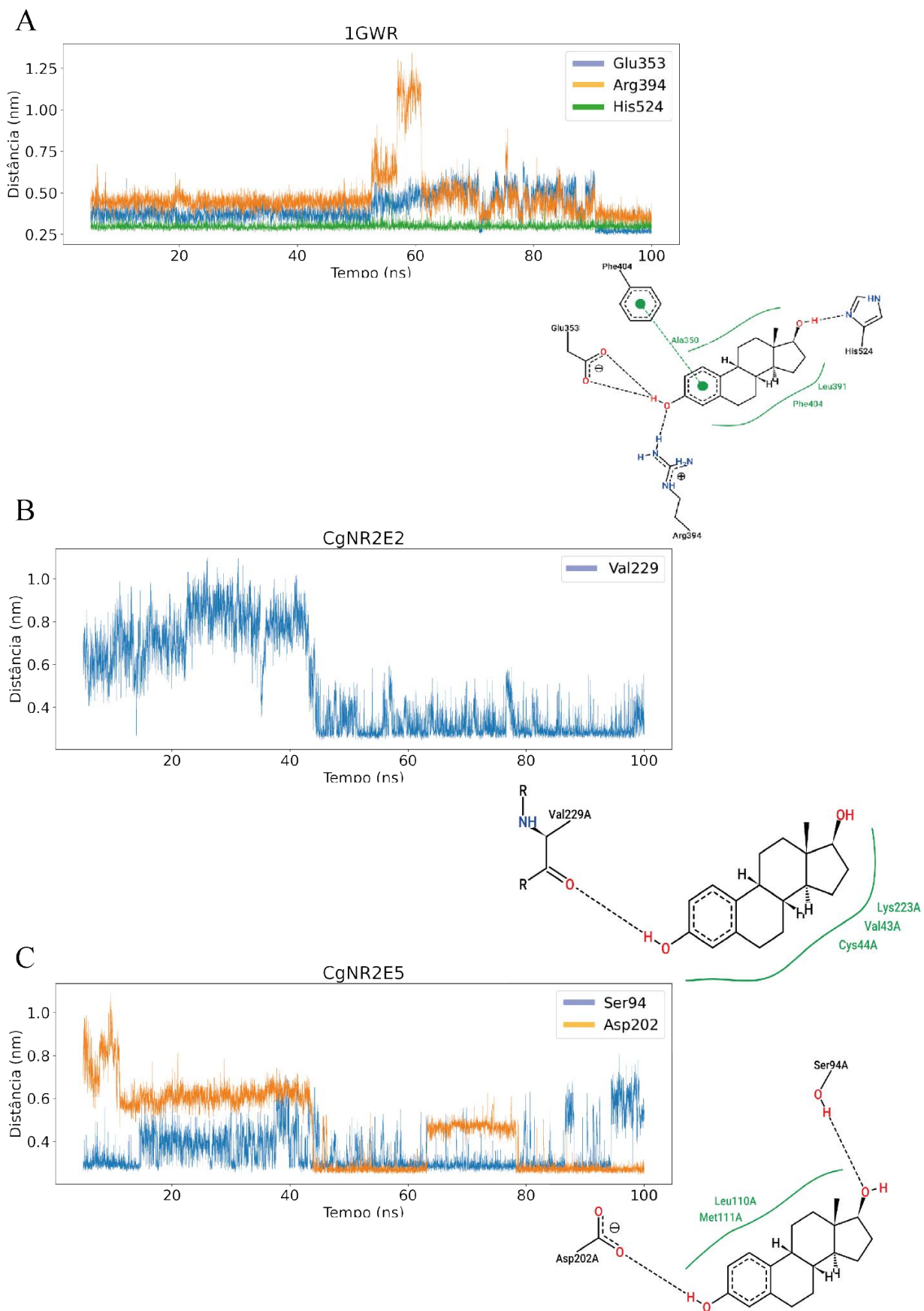
Figura 26. Gráfico em colunas da análise de decomposição de resíduos do candidato muito favorável à ligação com estradiol CgNR1D.



Fonte: Módulo gmx\_MMPBSA\_ana do pacote gmx\_MMPBSA, disponível em: [https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx\\_MMPBSA/](https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx_MMPBSA/).

## APÊNDICE D - Interações Polares

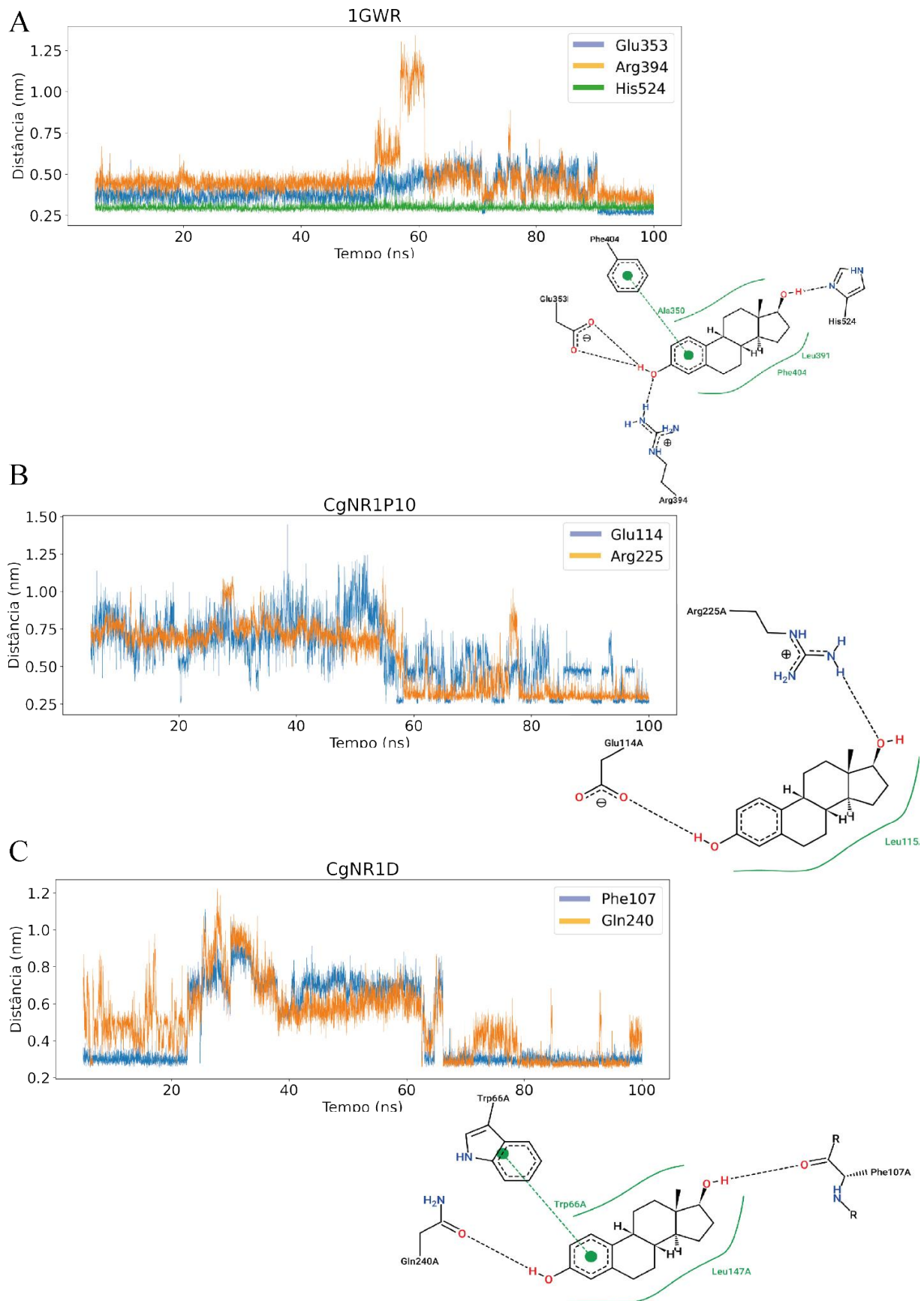
Figura 27. Ligações de hidrogênio encontradas para os complexos receptor-ligante dos candidatos muito favoráveis à ligação com estradiol CgNR2E2, CgNR2E5 e para a estrutura controle 1GWR. Para cada receptor, estão demonstrados um gráfico da distância entre o átomo doador e aceptor de elétrons ao longo dos 100 ns de simulação e um diagrama bidimensional indicando as interações químicas entre os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação e o ligante. Linhas tracejadas pretas indicam ligações de hidrogênio, linhas sólidas verdes indicam interações hidrofóbicas e linhas tracejadas verdes indicam interações  $\pi$ - $\pi$ . Perfil de interações encontradas para 1GWR (A), CgNR2E2 (B) e CgNR2E5 (C).



Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados obtidos nos programas PoseView (STIERAND; RAREY, 2010) e LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) e no módulo gmx\_distance do programa GROMACS (ABRAHAM et. al., 2015).



Figura 28. Ligações de hidrogênio encontradas para os complexos receptor-ligante dos candidatos muito favoráveis à ligação com estradiol CgNR1P10, CgNR1D e para a estrutura controle 1GWR. Para cada receptor, estão demonstrados um gráfico da distância entre o átomo doador e aceptor de elétrons ao longo dos 100 ns de simulação e um diagrama bidimensional indicando as interações químicas entre os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação e o ligante. Linhas tracejadas pretas indicam ligações de hidrogênio, linhas sólidas verdes indicam interações hidrofóbicas e linhas tracejadas verdes indicam interações  $\pi$ - $\pi$ . Perfil de interações encontradas para 1GWR (A), CgNR1P10 (B) e CgNR1D (C).



Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados obtidos nos programas PoseView (STIERAND; RAREY, 2010) e LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) e no módulo gmx\_distance do programa GROMACS (ABRAHAM et. al., 2015).

## ANEXO A - Oleate Hydratase in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 Catalyzes the Reversible Conversion between Linoleic Acid and Ricinoleic Acid.



RESEARCH ARTICLE



### Oleate Hydratase in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 Catalyzes the Reversible Conversion between Linoleic Acid and Ricinoleic Acid

Gabriela Christina Kuhl,<sup>a,b,f</sup> Ricardo Ruiz Mazzon,<sup>b</sup> Brenda Lee Simas Porto,<sup>c</sup> Tâmelâ Zamboni Madaloz,<sup>d</sup> Guilherme Razzera,<sup>d</sup> Daniel De Oliveira Patricio,<sup>b</sup> Kevin Linehan,<sup>e,f,g</sup> Grace Ahern,<sup>e,f,g</sup> Harsh Mathur,<sup>f</sup> Paul Ross,<sup>e</sup> Catherine Stanton,<sup>e,f</sup> Juliano De Dea Lindner<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

<sup>b</sup>Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup>Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

<sup>e</sup>APC Microbiome Ireland, University College Cork (UCC), Cork, Ireland

<sup>f</sup>Teagasc Food Research Centre, Fermoy, Ireland

<sup>g</sup>School of Microbiology, University College Cork (UCC), Cork, Ireland

**ABSTRACT** Conjugated linoleic acid (CLA) has been the subject of numerous studies in recent decades because of its associated health benefits. CLA is an intermediate product of the biohydrogenation pathway of linoleic acid (LA) in bacteria. Several bacterial species capable of efficiently converting LA into CLA have been widely reported in the literature, among them *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230. Over the last few years, a multicomponent enzymatic system consisting of three enzymes involved in the biohydrogenation process of LA has been proposed. Sequencing the genome of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 revealed only one gene capable of encoding an oleate hydratase (OleH), unlike the presence of multiple genes typically found in similar strains. This study investigated the biological effect of the OleH enzyme of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 on the hydration of LA and dehydration of ricinoleic acid (RA) and its possible role in the production of CLA. The OleH was cloned, expressed, purified, and characterized. Fatty acid measurements were made by an internal standard method using a gas chromatography-coupled flame ionization detector (GC-FID) system. It was found that the enzyme is a hydratase/dehydratase, leading to a reversible transformation between LA and RA. In addition, the results showed that *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 OleH protein plays a role in stress tolerance in *Escherichia coli*. In conclusion, the OleH of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 catalyzes the initial stage of saturation metabolism of LA, although it has not converted the substrates directly into CLA.

**IMPORTANCE** This study provides insight into the enzymatic mechanism of CLA synthesis in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and broadens our understanding of the bioconversion of LA and RA by OleH. The impact of OleH on the production of the c9, t11 CLA isomer and stress tolerance by *E. coli* has been assisted. The results provide an understanding of the factors which influence OleH activity. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 OleH presented two putative fatty acid-binding sites. Recombinant OleH catalyzed both LA hydration and RA dehydration. OleH was shown to play a role in bacterial growth performance in the presence of LA.

**KEYWORDS** biohydrogenation, heterologous expression, homology modeling, *cis*-9, *trans*-11 CLA

**Citation** Kuhl GC, Mazzon RR, Simas Porto BL, Zamboni Madaloz T, Razzera G, Patricio DDO, Linehan K, Ahern G, Mathur H, Ross P, Stanton C, De Dea Lindner J. 2021. Oleate hydratase in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 catalyzes the reversible conversion between linoleic acid and ricinoleic acid. *Microbiol Spectr* 9:e01179-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01179-21>.

**Editor** Jeffrey A. Galnick, University of Minnesota

**Copyright** © 2021 Kuhl et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Juliano De Dea Lindner, [juliano.lindner@ufsc.br](mailto:juliano.lindner@ufsc.br).

**Received** 31 August 2021

**Accepted** 6 September 2021

**Published** 13 October 2021

## ANEXO B - Emergence of two distinct SARS-CoV-2 Gamma variants and the rapid spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the second wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil.



Article

### Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil

Dayane Azevedo Padilha <sup>1</sup>, Vilmar Benetti Filho <sup>1</sup>, Renato Simões Moreira <sup>2</sup>, Tatiany Aparecida Teixeira Soratto <sup>1</sup>, Guilherme Augusto Maia <sup>1</sup>, Ana Paula Christoff <sup>3</sup>, Fernando Hartmann Barazzetti <sup>1</sup>, Marcos André Schörner <sup>1</sup>, Fernanda Luiza Ferrari <sup>1</sup>, Carolina Leite Martins <sup>1</sup>, Eric Kazuo Kawagoe <sup>1</sup>, Julia Kinetz Wachter <sup>1</sup>, Paula Sachet <sup>4</sup>, Antuani Rafael Baptistella <sup>5</sup>, Aline Daiane Schindwein <sup>6</sup>, Bruna Kellet Coelho <sup>7</sup>, Sandra Bianchini Fernandes <sup>7</sup>, Darcita Buerger Rovaris <sup>7</sup>, Marlei Pickler Debiasi dos Anjos <sup>7</sup>, Fernanda Rosene Melo <sup>8</sup>, Bianca Bittencourt <sup>8</sup>, Sthefani Cunha <sup>9</sup>, Karine Lena Meneghetti <sup>9</sup>, Nestor Wendt <sup>1</sup>, Tâmelza Zamboni Madaloz <sup>1</sup>, Marcus Vinícius Duarte Rodrigues <sup>1</sup>, Doris Sobral Marques Souza <sup>1</sup>, Milene Höehr de Moraes <sup>3</sup>, Rodrigo de Paula Baptista <sup>10</sup>, Guilherme Toledo-Silva <sup>1</sup>, Guilherme Razzera <sup>1</sup>, Edmundo Carlos Grisard <sup>1</sup>, Patricia Hermes Stoco <sup>1</sup>, Luiz Felipe Valter de Oliveira <sup>3</sup>, Maria Luiza Bazzo <sup>1</sup>, Gislaïne Fongaro <sup>1,\*†</sup> and Glauber Wagner <sup>1,\*†</sup>



**Citation:** Padilha, D.A.; Benetti Filho, V.; Moreira, R.S.; Soratto, T.A.T.; Maia, G.A.; Christoff, A.P.; Barazzetti, F.H.; Schörner, M.A.; Ferrari, F.L.; Martins, C.L.; et al. Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil. *Viruses* **2022**, *14*, 695. <https://doi.org/10.3390/v14040695>

Academic Editors: Joan Puig-Barberà, Maria Lourdes Guerrero, Anna Sominina, Svetlana V. Trushakova and F. Xavier López-Labrador

Received: 25 February 2022  
Accepted: 22 March 2022  
Published: 27 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil; dayufsc@gmail.com (D.A.P.); vilmarbf98@gmail.com (V.B.F.); tsoratto@gmail.com (T.A.T.S.); guiaugmaia@gmail.com (G.A.M.); fernandohb55@hotmail.com (F.H.B.); marcos.schorner@gmail.com (M.A.S.); ferrari.fernandal@gmail.com (F.L.F.); carol4952@hotmail.com (C.L.M.); kazuo.eric@gmail.com (E.K.K.); kinetzjulia@gmail.com (J.K.W.); nestor.wendt@ufsc.br (N.W.); tamelamadalo296@gmail.com (T.Z.M.); mrviniduarte@gmail.com (M.V.D.R.); doris.sobral@gmail.com (D.S.M.S.); guilherme.toledo@ufsc.br (G.T.-S.); guilherme.razzera@ufsc.br (G.R.); edmundo.grisard@ufsc.br (E.C.G.); patricia.stoco@ufsc.br (P.H.S.); marialuizabazzo@gmail.com (M.L.B.)
  - <sup>2</sup> Instituto Federal de Santa Catarina, Lages 88506-400, Brazil; renatosm@gmail.com
  - <sup>3</sup> Biome-Hub Pesquisa e Desenvolvimento, Florianópolis 88054-700, Brazil; anachff@biome-hub.com (A.P.C.); milene.hoehr@biome-hub.com (M.H.d.M.); felipe@biome-hub.com (L.F.V.d.O.)
  - <sup>4</sup> Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-220, Brazil; pssachet@gmail.com
  - <sup>5</sup> Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba 89600-000, Brazil; antuani.baptistella@unoesc.edu.br
  - <sup>6</sup> Secretaria de Estado da Saúde, Florianópolis 88015-130, Brazil; alineds10@yahoo.com.br
  - <sup>7</sup> Laboratório Central do Estado da Saúde de Santa Catarina, Florianópolis 88010-001, Brazil; brunakellet@gmail.com (B.K.C.); genomiclacensc@gmail.com (S.B.F.); darcitarovaris@gmail.com (D.B.R.); marlepickler@saude.sc.gov.br (M.P.D.d.A.)
  - <sup>8</sup> Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina, Florianópolis 88015-130, Brazil; fernandar.melo@gmail.com (F.R.M.); bittenka@gmail.com (B.B.)
  - <sup>9</sup> Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, Chapecó 70040-903, Brazil; sthefani.cunha@sc.senai.br (S.C.); karine.meneghetti@sc.senai.br (K.L.M.)
  - <sup>10</sup> University of Georgia, Athens, GA 30602, USA; rodrigobaptista@gmail.com
- \* Correspondence: gislaïne.fongaro@ufsc.br (G.F.); glauber.wagner@ufsc.br (G.W.); Tel.: +55-48-3721-2956 (G.F. & G.W.)  
† These authors were co-principal investigators.

**Abstract:** The western mesoregion of the state of Santa Catarina (SC), Southern Brazil, was heavily affected as a whole by the COVID-19 pandemic in early 2021. This study aimed to evaluate the dynamics of the SARS-CoV-2 virus spreading patterns in the SC state from March 2020 to April 2021 using genomic surveillance. During this period, there were 23 distinct variants, including Beta and Gamma, among which the Gamma and related lineages were predominant in the second pandemic wave within SC. A regionalization of P.1-like-II in the Western SC region was observed, concomitant to the increase in cases, mortality, and the case fatality rate (CFR) index. This is the first evidence of the regionalization of the SARS-CoV-2 transmission in SC and it highlights the importance of tracking the variants, dispersion, and impact of SARS-CoV-2 on the public health systems.

**Keywords:** SARS-CoV-2; surveillance; genome; SARS-CoV-2 P.1 variant

**ANEXO C - Participação na Dissertação de mestrado: Identificação de grupos de genes ortólogos em modelos vertebrados e invertebrados: características e análises comparativas.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO

Ariane Nicaretta Amorim

**Identificação de grupos de genes ortólogos em modelos vertebrados e invertebrados:**  
características e análises comparativas

Florianópolis  
2021