

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Júlia Ferreira

**Caracterização estrutural da enzima Glutathione S-transferase alfa 1.2 de ostra
Crassostrea gigas (Thunberg, 1793): uma abordagem *in silico***

Florianópolis

2022

Júlia Ferreira

Caracterização estrutural da enzima Glutathione S-transferase alfa 1.2 de ostra
Crassostrea gigas (Thunberg, 1793): uma abordagem *in silico*

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientador: Prof. Guilherme Razzera Maciel, Dr.
Coorientadora: Tâmelá Zamboni Madaloz, M.^a

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra

Ferreira, Júlia

Caracterização estrutural da enzima Glutathione S transferase alfa 1.2 de ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793): uma abordagem in silico / Júlia Ferreira ; orientador, Guilherme Razzera, coorientador, Tâmelá Zamboni Madaloz, 2022.

56 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Dinâmica molecular.. 3. Atracamento molecular. 4. Bioinformática. 5. CDNB. I. Razzera, Guilherme . II. Madaloz, Tâmelá Zamboni. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Júlia Ferreira

**Caracterização estrutural da enzima Glutathione S-transferase alfa 1.2 de ostra
Crassostrea gigas (Thunberg, 1793): uma abordagem *in silico***

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 26 de julho de 2022.

Prof.^a Daniela Cristina de Toni, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Guilherme Razzera Maciel, Dr.
Orientador
BQA/UFSC

Prof.^a Flávia Lucena Zacchi, Dr.^a
Avaliadora
AQU/UFSC

Karin dos Santos, M.^a
Avaliadora
BQA/UFSC

Este trabalho é dedicado às pessoas queridas que estiveram ao meu lado durante minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e familiares, que sempre me incentivaram e deram todo o apoio necessário para que eu pudesse estudar e seguir minhas próprias convicções.

Ao meu orientador Guilherme Razzera, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, por toda a paciência, respeito e humanidade ao conduzir meu trabalho de conclusão de curso.

Às membras da banca Flávia Zacchi e Karin dos Santos, que aceitaram avaliar meu trabalho. Como mulheres cientistas, biólogas e competentes no que fazem, vocês me inspiram.

Aos meus colegas de laboratório Theo, Karin, e especialmente, à Tâmela, por ser tão comprometida, querida e se disponibilizar a me ajudar em todas as etapas.

Ao LABCAI, em especial, aos seus membros Luiz, Flávia e Vanessa por compartilharem comigo o mundo das GSTs.

Aos meus amigos, Iroko, Luiza, Marianna, Escarlet, Isabelle, Amanda, Nayara, Juliano, Monique e Victória, que fizeram da universidade, para mim, um espaço-tempo para além de uma experiência acadêmica.

Ao meu namorado Davi, por ser uma fonte de arte, amor e graça na minha vida.

Ao meu psicanalista Gabriel Bueno, por esses anos de escuta e por me ajudar a ver, sentir e ser para além do que eu imaginava conseguir.

Ao curso de Ciências Biológicas, por ter me apresentado a vida de uma forma tão diversa, conectada e inspiradora.

À UFSC, por ser uma universidade pública e de qualidade, que me proporcionou um desenvolvimento acadêmico, profissional, social e político durante esses seis anos.

Ao CNPq, pela bolsa de iniciação científica.

À ciência, que me traz esperanças.

À arte, que me deixa viva.

“ We must be clear that when it comes to atoms, language can be used only as in poetry. The poet, too, is not nearly so concerned with describing facts as with creating images and establishing mental connections.” - Neils Bohr, 1920.

RESUMO

As Glutathione S-Transferases (GSTs) são uma família de enzimas de biotransformação de fase II encontradas na maioria dos grupos animais. Suas isoformas são amplamente utilizadas como biomarcadores de contaminação aquática nas mais diversas espécies, inclusive na ostra *Crassostrea gigas*, referência para estudos com biomarcadores em moluscos bivalves. As GSTs da classe alfa são conhecidas por metabolizar diversos compostos e, além da atividade transferase, podem atuar como peroxidases e isomerases. Em vertebrados, estudos mostram sua capacidade de conjugar substratos como o CDNB, 4-HNE e (+)-*anti*-BPDE com a molécula de glutathione. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi fazer a caracterização estrutural de um modelo enzimático da isoforma GST alfa1.2 de *C. gigas*, criado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, através de testes de interação com esses ligantes. Metodologias computacionais como atracamento e dinâmica molecular, foram empregadas e conseguimos avaliar a interação da enzima *CgGSTA1.2* com os ligantes CDNB, 4-HNE e (+)-*anti*-BPDE conjugados à glutathione. Nossos resultados demonstraram que os substratos CDNB e (+)-*anti*-BPDE são fortes candidatos à metabolização por essa isoforma. Em dados apresentados em estudos anteriores foi demonstrado, que *CgGSTA1.2*, de fato, é capaz de metabolizar o substrato CDNB *in vitro*. Sendo assim, avaliamos através de simulações de dinâmica molecular o comportamento desse ligante conjugado à glutathione no sítio catalítico da enzima. Os resíduos Y13, G18, R19, Q58, P60, T72, L111, F115, Y214 e V218, apareceram como contribuintes para diminuir a energia livre do complexo *CgGSTA1.2*-ligante. Sete dessas interações são conservadas na estrutura cristalográfica de GST alfa de *Gallus gallus* usada como referência. Entretanto, a interação com o aminoácido tirosina 214 parece ser particular da isoforma GST alfa1.2 de ostra.

Palavras-chaves: Dinâmica molecular. Atracamento molecular. Bioinformática. CDNB.

ABSTRACT

The Glutathione S-transferases (GSTs) are a family of enzymes involved in phase II biotransformation reactions, present in different animal groups. The GSTs isoforms are usually used as biomarkers of aquatic contamination in several species, including the oyster *Crassostrea gigas*, which is a bivalve mollusk reference in biomarker studies. The alpha GST class is characterized to metabolize several compounds, besides transferase activity, they can also act as peroxidases and isomerases. In vertebrate animals, previous studies showed these enzymes were able for CDNB, 4-HNE, and (+)-*anti*-BPDE binding. In this study we aimed to perform the structural characterization of the tridimensional protein model of alpha1.2 GST isoform of *C. gigas*. Those ligand binding interactions were previously reported by our research group and used as starting points in this work. The molecular docking methodology was employed to evaluate the CDNB, 4-HNE, and (+)-*anti*-BPDE binding modes in the *CgGSTA1.2* catalytic site, and our results showed this enzyme isoform was a candidate to metabolize CDNB and (+)-*anti*-BPDE substrates. The results of Deconto's (2022) studies confirmed that *CgGSTA1.2* is able to metabolize CDNB in vitro. Thus, we employed the molecular dynamic simulation methodology to evaluate the *CgGSTA1.2* in complex with glutathione conjugate of CDNB during 150 ns. Our results showed the amino acids Y13, G18, R19, Q58, P60, T72, L111, F115, Y214 e V218 are responsible for lowering the free energy of the complex *CgGSTA1.2*-ligand. Seven of these bindings are conserved in the crystal structure of *Gallus Gallus* used as a reference in this study. By contrast, the binding with the amino acid tyrosine 214 seems to be unique to the oyster alpha1.2 GST isoform.

Keywords: Molecular dynamic. Molecular docking. Bioinformatics. CDNB.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação tridimensional do modelo monomérico da isoforma *CgGSTA1.2*, com suas estruturas secundárias identificadas e enumeradas..... 22
- Figura 2. Representação tridimensional do modelo dimérico da isoforma *CgGSTA1.2*, com suas duas cadeias identificadas..... 23
- Figura 3. Sobreposição das posições do ligante GDN no modelo *CgGSTA1.2* (roxo) com a posição na estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza claro). E sobreposição das posições do ligante GDN no *redocking* feito com a estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza escuro) com a posição original tirada desta (cinza claro)..... 28
- Figura 4. Representação 2D das interações do ligante GDN no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*. Ligações de hidrogênio estão representadas em verde, com os aminoácidos Y13, R104 e Y214. Interações hidrofóbicas estão representadas em vermelho, com os aminoácidos F14, V59, Q58, L222 e R224. 29
- Figura 5. Representação 2D das interações do ligante GDN no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2* e da estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (em cinza ao fundo) sobrepostas. Os círculos em vermelho indicam as conservações de posição entre os resíduos de ambas as estruturas, calculadas pelo próprio *software* LigPLot..... 29
- Figura 6. Sobreposição das posições do ligante HAG no modelo *CgGSTA1.2* (roxo) com a posição na estrutura cristalográfica PDB:1b48 (cinza claro). E sobreposição das posições do ligante HAG no *redocking* feito com a estrutura cristalográfica PDB:1b48 (cinza escuro) com a posição original tirada desta (cinza claro)..... 31
- Figura 7. Representação 2D das interações do ligante HAG no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*. Ligações de hidrogênio estão representadas em verde, com os aminoácidos G73 e R104. Interações hidrofóbicas estão representadas em vermelho, com os aminoácidos F14, R19 e T72. 31
- Figura 8. Representação 2D das interações do ligante HAG no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2* e da estrutura cristalográfica PDB:1b48 (em cinza ao fundo) sobrepostas. Os círculos em vermelho indicam as conservações de posição entre os resíduos de ambas as estruturas, calculadas pelo próprio *software* LigPLot..... 32
- Figura 9. Sobreposição das posições do ligante GBX no modelo *CgGSTA1.2* (roxo) com a posição na estrutura cristalográfica PDB:1ml6 (cinza claro). E sobreposição das posições do ligante GBX no *redocking* feito com a estrutura cristalográfica PDB:1ml6 (cinza escuro) com a posição original tirada desta (cinza claro)..... 34

- Figura 10. Representação 2D das interações do ligante GBX no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*. Ligações de hidrogênio estão representadas em verde, com os aminoácidos K57, Q58 e V59. Interações hidrofóbicas estão representadas em vermelho, com os aminoácidos R19, L111, F115, L222 e R224. 34
- Figura 11. Representação 2D das interações do ligante GBX no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2* e da estrutura cristalográfica PDB:1ml6 (em cinza ao fundo) sobrepostas. Os círculos em vermelho indicam as conservações de posição entre os resíduos de ambas estruturas, calculadas pelo próprio *software* LigPLOT. 35
- Figura 12. Gráfico do RMSD da posição do ligante GDN no sítio de ligação do modelo proteico *CgGSTA1.2* (roxo) e da estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza), durante a trajetória de 150 ns em simulação de dinâmica molecular atomística. 37
- Figura 13. Representação 2D das interações do ligante GDN no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*, após 150 ns de trajetória em simulação de dinâmica molecular atomística. Ligações de hidrogênio estão representadas em verde, com os aminoácidos Y13, Y107, Y214 e D105(B). Interações hidrofóbicas estão representadas em vermelho, com os aminoácidos I215 e V218. 38
- Figura 14. Sobreposição das posições iniciais e finais da simulação de dinâmica molecular para o ligante GDN no modelo *CgGSTA1.2* (roxo) e na estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza). As posições do início da trajetória estão representadas em roxo e cinza claro, enquanto as posições finais, após 150 ns de simulação, estão representadas em roxo e cinza escuro. 39
- Figura 15. Gráfico da variação da distância entre os átomos doadores e aceptores de elétrons na ligação de hidrogênio entre o resíduo de tirosina e o ligante, durante os 150 ns de trajetória de dinâmica molecular para o modelo *CgGSTA1.2* (roxo) e para a estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza). 40
- Figura 16. Gráfico de RMSF da estrutura proteica do modelo *CgGSTA1.2*, durante as trajetórias de 150 ns nas simulações de dinâmica molecular atomística com a presença do ligante GDN (roxo) e sem a presença do ligante (rosa). E também da trajetória com a estrutura proteica cristalográfica PDB:1vf3 na presença do ligante GDN (cinza). Embaixo, uma representação 3D da movimentação dos resíduos do modelo *CgGSTA1.2* durante a trajetória de dinâmica molecular com a presença do ligante GDN, quanto maior a movimentação, mais quentes as cores e mais largo é representada a linha da cadeia principal da proteína. 41

- Figura 17. Gráfico da variação de energia livre de ligação dos sistemas *CgGSTA1.2*-GDN (roxo) e estrutura cristalográfica PDB:1vf3-GDN (cinza), durante os 20 ns finais das trajetórias de dinâmica molecular atomística. Considerando apenas as contribuições entálpicas. 43
- Figura 18. Gráficos da contribuição dos resíduos para a energia livre de ligação proveniente da análise de decomposição de energia para os 20 ns finais da trajetória de dinâmica molecular atomística. (A) Decomposição de energia para o complexo *CgGSTA1.2*-GDN. (B) Decomposição de energia para o complexo estrutura cristalográfica PDB:1vf3-GDN, que foi usado como controle positivo. 43
- Figura 19. Alinhamento das sequências de GST alfa de *Gallus gallus* (estrutura cristalográfica PDB:1vf3) em cinza, com a sequência de GST alfa1.2 de *Crassostrea gigas* em rosa. Com destaque para os resíduos conservados e que são responsáveis pela estabilidade do complexo proteína-ligante em ambas estruturas. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de RMSD e de energia livre das melhores posições do ligante encontradas através do atracamento molecular com o modelo estrutural <i>CgGSTA1.2</i> e com os cristais usados como controles positivos.	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔG – Variação de energia livre de Gibbs

ΔH – Variação de entalpia

ΔS – Variação de entropia

(+)-*anti*-BPDE – (+)-*anti*-benzo[*a*]pireno diol epóxido

μmol – Micromol

4-HNE – 4-hidroxinonenal

Å – Angstrom

Atm – Atmosfera

Apo – Apoproteína

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

DM – Dinâmica Molecular

GBX – (+)-*anti*-BPDE conjugado à GSH

GDN – CDNB conjugado à GSH

GSTs – Glutathionas-S-transferases

GSH – Glutathiona reduzida

HAG – 4-HNE conjugado à GSH

Holo – Holoproteína

K_m – Constante de Michaelis

mg – Miligrama

min – Minuto

mM – Milimolar

nm – Nanômetro

ns – Nanossegundo

PAHs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

PCBs – Bifenilos Policlorados

PCDFs – Dibenzofuranos Policlorados

PDB – Banco de Dados de Proteína

OCPs – Pesticidas Oganoclorados

RMSD – Raiz do Desvio Quadrático Médio

RMSF – Raiz da Flutuação Quadrática Média

V_{max} – Velocidade máxima da reação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 ECOTOXICOLOGIA NO CONTEXTO DOS AMBIENTES AQUÁTICOS	15
1.2 O PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO E AS ENZIMAS DA FAMÍLIA DAS GLUTATIONAS S-TRANSFERASES	16
1.3 CARACTERÍSTICAS DAS GSTs DA CLASSE ALFA.....	18
1.4 ESTUDOS COM A ESPÉCIE <i>Crassostrea gigas</i> E O MODELO DA ISOFORMA <i>CgGSTA1.2</i>	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 METODOLOGIA.....	24
3.1 ATRACAMENTO MOLECULAR PROTEÍNA-LIGANTE	24
3.2 DINÂMICA MOLECULAR ATOMÍSTICA	26
4 RESULTADOS	27
4.1 ATRACAMENTO MOLECULAR COM OS LIGANTES DE INTERESSE.....	27
4.1.1 Ligação de <i>CgGSTA1.2</i> com GSH conjugada ao CDNB (GDN).....	27
4.1.2 Ligação de <i>CgGSTA1.2</i> com GSH conjugada ao 4-hidroxinonal (HAG)	30
4.1.3 Ligação de <i>CgGSTA1.2</i> com GSH conjugada ao (+)- <i>anti</i> -BPDE (GBX)	33
4.2 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR COM O LIGANTE CDNB	37
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO.....	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 ECOTOXICOLOGIA NO CONTEXTO DOS AMBIENTES AQUÁTICOS

A ecotoxicologia é uma área de pesquisa multidisciplinar que se propõe estudar a exposição e o efeito de estressores ambientais em diferentes escalas dimensionais, desde moleculares até níveis biosféricos, tendo como principal objetivo o entendimento e predição das consequências causadas por contaminantes em sistemas biológicos (TLILI; MOUNEYRAC, 2021). Sabe-se que os ambientes marinhos e estuarinos, além de serem importantes provedores de recursos, e também por conta disso, têm sofrido com a pressão antrópica. Segundo estudos de Halpern et al., (2015), 97,7% esses ecossistemas estão sendo afetados por múltiplos estressores provenientes do estilo de vida humano.

As regiões costeiras, por estarem mais próximas das comunidades humanas, logo tornam-se também mais suscetíveis a muitos desses impactos. Como exemplo, a poluição causada pelo recorrente depósito de resíduos advindos de efluentes domésticos e industriais, os quais são compostos por misturas bastante complexas de contaminantes de diferentes naturezas químicas, conhecidos tecnicamente por xenobióticos (ZACCHI, 2017). Muitos xenobióticos são moléculas orgânicas de natureza lipofílica, como por exemplo, os bifenilos policlorados (PCBs), os pesticidas organoclorados (OCPs), os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), os dibenzofuranos policlorados (PCDFs), entre outros. E por conta disso, tornam-se difíceis de serem excretadas pelos organismos que são expostos à eles nos ambientes aquáticos, devido sua baixa solubilidade no meio interno (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A presença dos xenobióticos nos ecossistemas não quer dizer necessariamente que haverá prejuízo para a vida ali presente. Sendo assim, estudos que consigam acoplar informações sobre os níveis externos, os níveis de contaminação/bioacumulação e as consequências que essa contaminação pode causar, são cada vez mais necessários (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). E existem diferentes formas de fazê-los, sendo uma delas através de biomarcadores.

Um biomarcador pode ser definido como qualquer alteração na resposta biológica (seja em escala molecular, celular, fisiológica ou comportamental) de um organismo frente à toxicidade de contaminantes que chegam em seu ambiente (PEAKALL; WALKER, 1994). Sendo assim, eles podem servir como sinalizadores da degradação de ecossistemas antes

mesmo que danos em escalas maiores, como a nível populacional e de comunidade, sejam detectados. E também existem algumas vantagens no uso de biomarcadores em pesquisas de ecotoxicologia, quando comparados às análises químicas comuns, como as de bioconcentração dos compostos nos tecidos, uma vez que, o custo e a complexidade técnica é menor, além de poder detectar mudanças antes do nível populacional (GALLOWAY *et al.*, 2002).

Considerando a variabilidade nas condições ambientais e no próprio metabolismo de cada indivíduo, as respostas de biomarcadores nem sempre são padronizadas, por isso, torna-se necessário estudos que apontem e detalhem estas respostas metabólicas nos organismos bioindicadores. Sendo assim, um bioindicador pode ser definido como uma espécie, população ou comunidade que nos fornece informações sobre as condições ambientais de seu habitat, seja pela sua presença, ausência, mudanças fisiológicas ou comportamentais (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A espécie de ostra *Crassostrea gigas* (*C. gigas*), popularmente conhecida como ostra do Pacífico, é originária da região do Japão (SILVA, 2010). Contudo, ao longo dos anos foi introduzida em diversos países, sendo hoje, o molusco bivalve mais cultivado e consumido do mundo (NUNES, 2013). Além de seu valor econômico, *C. gigas* também desempenha um importante papel para a ecotoxicologia nas regiões estuarinas e entre marés nas quais habita, uma vez que, nestes ambientes os moluscos bivalves são considerados um grupo referência de bioindicadores. Isso porque, além de sua ampla distribuição geográfica, são animais sésseis e filtradores, o que os tornam incapazes de escapar do estresse ambiental, logo, são mais suscetíveis a seleção natural por estresse ambiental, tornando-as muitas vezes, organismos tolerantes à poluição de seus habitats (ZHANG *et al.*, 2016).

1.2 O PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO E AS ENZIMAS DA FAMÍLIA DAS GLUTATIONAS S-TRANSFERASES

Ao longo da evolução diferentes mecanismos adaptativos foram desenvolvidos pelas espécies, tornando-as capazes de lidar com a toxicidade de seus meios, tanto externos quanto internos. Nesse sentido, podemos citar o processo de biotransformação de xenobióticos como um importante mecanismo adaptativo das ostras e de diversos outros organismos aos seus ambientes, por ter como finalidade tornar moléculas que são difíceis de serem excretadas pelas células em compostos mais facilmente excretáveis (SACCO, 2006).

A via de biotransformação passa por duas fases antes que a molécula consiga ser excretada da célula. Durante a fase I é a responsável pela conversão dos xenobióticos em substratos mais hidrofílicos para a ação das enzimas de fase II. Sendo assim, as células utilizam sistemas enzimáticos que transferem um átomo de oxigênio do oxigênio molecular para o substrato xenobiótico, isso pode acontecer, especialmente, através do sistema das amino-oxigenases ou do citocromo P450 (HODGSON, 2010), ambos localizados no retículo endoplasmático.

Já a fase II, é caracterizada por reações de conjugação que consistem na transferência de um grupo polar grande aos produtos gerados pela fase I, com a finalidade de torná-los menos reativos e fáceis de serem excretados pelas células. Essas reações de conjugação, por sua vez, acontecem em sua maior parte no citosol e podem ser realizadas por processos enzimáticos envolvendo a molécula de glutathiona reduzida (GSH) (HODGSON, 2010). A glutathiona é um tripeptídeo endógeno encontrado em diversos tecidos de diferentes organismos, é formada por uma sequência aminoacídica de ácido glutâmico, cisteína e glicina, tem um baixo peso molecular e é muito solúvel em água (ALIAS, 2016). Devido sua solubilidade e às propriedades do grupo tiol presente em sua estrutura, ela torna-se um alvo interessante para diferentes processos catalíticos, envolvendo enzimas como redutases, peroxidases e transferases (MANNERVIK, 1986; VAN BLADEREN, 2000).

As Glutathionas S-transferases (GSTs) formam uma família de enzimas capaz de catalisar a reação de conjugação que compõe a fase II do processo de biotransformação, geralmente obtendo como resultado final da reação o próprio conjugado que será excretado pela célula (ZIMNIAK; SINGH, 2006). Quatro grandes grupos com atividades de GST são incluídos nessa família de enzimas, entre eles estão: as proteínas bacterianas de resistência à fosfomicina, proteínas associadas à membrana no metabolismo eicosanoide e glutathiona (MAPEG), GSTs classe kappa e as GSTs citosólicas (ZIMNIAK; SINGH, 2006).

Dentre os quatro grupos, as GSTs citosólicas são as mais abundantes e heterogêneas entre si. Elas foram primeiramente estudadas em mamíferos e suas isoformas foram encontradas e classificadas de acordo com suas sequências aminoacídicas nas seguintes classes: alfa, mu, ômega, pi, sigma, teta e zeta (HAYES; STRANGE, 2000; SHEEHAN *et al.*, 2001). Com o tempo, as diferentes isoformas de GSTs também foram estudadas em outros organismos como os peixes, invertebrados, plantas e bactérias, sendo assim, outras sete classes de GSTs citosólicas foram descobertas: beta, delta, epsilon, lambda, phi, rho e tau (SHEEHAN *et al.*, 2001; DIXON *et al.*, 2002; VUILLEUMIER, 1997).

Estruturalmente, as GSTs citosólicas são enzimas diméricas com a presença de um sítio catalítico em cada uma de suas subunidades. Em cada sítio catalítico também há duas regiões distintas, uma delas é mais hidrofílica, localizada no domínio N-terminal da enzima, que é por onde o substrato endógeno (GSH) interage, chamado sítio G. A outra região apresenta aspectos mais hidrofóbicos, que é por onde os substratos eletrofílicos interagem, chamado sítio H, o qual utiliza tanto elementos do domínio N-terminal quanto do C-terminal para se constituir (DIRR; REINEMER; HUBER, 1994; ZIMNIAK, 2006). O domínio N-terminal é formado por 4 folhas- β e 3 α -hélices semelhante as tioredoxinas, compondo $\frac{1}{3}$ da proteína e o domínio C-terminal é formado unicamente por α -hélices, compondo $\frac{2}{3}$ da proteína (DOURADO; FERNANDES; RAMOS, 2008).

Diferentemente do sítio G, que é bem conservado entre as GSTs citosólicas, o sítio H varia bastante entre as classes. Visto que essa estrutura evoluiu para acomodar diversos grupos de substratos eletrofílicos, é sabido que até mesmo dentro de uma mesma classe existem diferenças na estrutura do sítio H, e possivelmente, na metabolização dos substratos (ZIMNIAK, 2006), especialmente quando se compara entre espécies diferentes. Devido a essas particularidades, torna-se necessário identificar e estudar as características de cada classe de GST presente em uma espécie, para se ter uma visão mais abrangente do que estes organismos são capazes de metabolizar.

1.3 CARACTERÍSTICAS DAS GLUTATIONAS S-TRANSFERASES DA CLASSE ALFA

Na revisão feita por Park e colaboradores (2020), foi proposta uma filogenia da família de GSTs em organismos marinhos, onde foi sugerido a classe kappa (mitocondrial) como o grupo mais ancestral. A partir dela há uma primeira divergência dando origem a dois caminhos evolutivos para as GSTs, em um deles ocorre a subdivisão das classes alfa, mu, pi e sigma, sendo esta última a que divergiu mais recentemente. Em estudos com mamíferos, também já foi proposto que as classes alfa, mu e pi sejam próximas filogeneticamente, sendo elas também as mais abundantes deste grupo de animais (ZIMNIAK; SINGH, 2006; SINNING *et al.*, 1993).

Apesar destas classes compartilharem de muitas características estruturais, especialmente do domínio N-terminal, como por exemplo, o aminoácido conservado de tirosina no sítio catalítico da enzima, que ajuda na estabilização da GSH através de uma ligação de hidrogênio com o átomo de enxofre do tripeptídeo (OAKLEY *et al.*,

1997; CAMERON *et al.*, 1995; RAGHUNATHAN *et al.*, 1994), existem diferenças significativas entre elas. A classe alfa, diferentemente da mu e da pi, apresenta um resíduo de arginina, conservado em grande parte das isoformas, que também é responsável pelo processo de estabilização da GSH no sítio ativo juntamente com a tirosina (BJÖRNESTEDT *et al.*, 1995). Além disso, a classe alfa também possui uma α -hélice a mais no domínio C-terminal de sua estrutura, tendo essa região uma grande mobilidade capaz até de bloquear o sítio ativo (DOURADO; FERNANDES; RAMOS, 2008). Contudo, estudos nos mostram que quando o substrato se liga ao sítio da enzima, a região C-terminal composta pela α -hélice extra gera uma conformação enzimática mais fechada e estabilizada quando comparada às classes mu e pi que não possuem a α -hélice, evidenciando a importância dessa estrutura para a função catalítica (GUSTAFSSON *et al.*, 1999; DIRR; WALLACE, 1999).

Uma reação padrão catalisada pela família enzimática das GSTs é a formação de um tioéter entre a GSH e uma molécula eletrofílica. Sendo assim, para verificar esta atividade catalítica, geralmente usa-se um substrato artificial chamado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (ZIMNIAK, 2006), uma vez que substratos fisiologicamente relevantes para estudar este tipo de reação são mais escassos e caros. Por ser uma molécula pequena, ele se acomoda bem no sítio H de muitas das classes de GSTs e por conta disso pode ser considerado um substrato quase que universal para essa família de enzimas (ZIMNIAK, 2006). A reação de conjugação da glutatona com o CDBN é uma substituição nucleofílica aromática, no qual o grupo cloreto ligado ao anel aromático é substituído pela glutatona (ZIMNIAK, 2006). Apesar de existir algumas exceções para a metabolização de CDBN, até hoje, estudos demonstram que as GSTs da classe alfa, no geral, são capazes de realizar este tipo de reação (EATON; BAMMLER 1999; KONISHI *et al.*, 2005).

Um outro substrato estudado nas GSTs da classe alfa é o 4-hidroxinonal (4-HNE), este é um composto endógeno resultante da peroxidação lipídica, que possui efeitos tóxicos no ambiente celular, e está relacionado a algumas doenças em humanos como, Parkinson e Alzheimer (YORITAKA *et al.*, 1996; MONTINE *et al.*, 1996). Diferentemente do CDBN, a reação de conjugação do 4-HNE com a glutatona é uma adição nucleofílica, portanto, a glutatona é adicionada a um composto carbonílico α,β insaturado (ZIMNIAK, 2006). Tanto em humanos quanto em roedores foi identificado uma subclasse específica dentro das GSTs alfas que se diferencia do restante por serem capazes de realizar essa reação de adição nucleofílica e metabolizar muito bem o 4-HNE, a hGSTA4-4 e a mGSTA4-4, respectivamente (BRUNS *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 1999). Essas subclasses se caracterizam

por possuírem algum aminoácido com grupamento acessível para interagir com o grupo carbonílico do 4-HNE, o que não é encontrado em outras isoformas de GSTs da classe alfa, e este é o motivo que sugere sua especificidade por esse substrato, uma vez que não possuem uma atividade aumentada também em relação ao CDNB, por exemplo (ZIMNIAK, 2006).

Reações de conjugação da GSH com alguns outros substratos também já foram estudados em GSTs da classe alfa. Compostos como o (+)-*anti*-benzo[*a*]pireno diol epóxido (BPDE), um derivado cancerígeno do benzo[*a*]pireno, são capazes de se conjugar a glutathione também através de reações de adição nucleofílica mediada pela ação das GSTs (ZIMNIAK, 2006). Em geral, as classes mu e pi são as que melhor metabolizam os epóxidos. Em relação ao (+)-*anti*-BPDE, em humanos e ratos, foi demonstrado que as isoformas da classe pi possuem maior atividade catalítica para este substrato, contudo, algumas subclasses de GSTs da classe alfa também são capazes de metabolizar o (+)-*anti*-BPDE nestes organismos, apesar de apresentarem uma eficiência menor (ROBERTSON et al., 1986a; ROBERTSON et al., 1986b; SINGH *et al.*, 2004).

Além da atividade transferase, as GSTs da classe alfa também possuem capacidade de catalisar outros tipos de reações, um exemplo disso são as reações de peroxidação, utilizando a GSH como agente redutor para transformar hidroperóxidos orgânicos em seus álcoois correspondentes, estudos com enzimas humanas mostram a atividade peroxidase das GSTs com substratos como hidroperóxido de cumeno e alguns hidroperóxidos de lipídeos, portanto sem atividade para os hidroperóxidos de hidrogênio (MANNERVIK; DANIELSON; KETTERER, 1988). A atividade de isomerase também é observada nas GSTs da classe alfa de humanos, para a síntese de hormônios esteróides, como a testosterona e progesterona (JOHANSSON; MANNERVIK, 2001).

Com isso, é possível observar que existem diferentes tipos de reações que a família das GSTs são capazes de catalisar e conseqüentemente muitos substratos nos quais podem atuar. Contudo, a maior parte destes estudos se concentram em classificar e caracterizar estas enzimas em organismos mamíferos, e pouco se tem feito com animais invertebrados. Considerando o papel de organismos bioindicadores como as ostras e dos biomarcadores de contaminação ambiental como as GSTs, em estudos ecotoxicológicos, torna-se evidente a importância de se caracterizar esta família enzimática nestes organismos também.

1.4 ESTUDOS COM A ESPÉCIE *Crassostrea gigas* E O MODELO DA ISOFORMA *CgGSTA1.2*

Em trabalhos ainda não publicados de Zacchi e colaboradores, feitos no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), foi realizada uma identificação das classes e subclasses de GSTs da ostra *C. gigas*. Este estudo foi realizado através de transcriptomas de diversos tecidos e do genoma completo de ostra publicado por Zhang *et al.*, (2012) e atualizado por Wang *et al.*, (2019), que podem ser encontrados nos bancos de dados públicos. Sendo assim, foram encontradas sequências referentes a 24 isoformas de GSTs em *C. gigas*: 17 destas pertencentes às classes que contemplam as enzimas citosólicas (ômega, teta, alfa, pi, mi, sigma, delta e rho), 1 isoforma da classe mitocondrial (kappa) e 6 isoformas pertencente às GSTs microssomais.

A partir da identificação das sequências referentes as GSTs de *C. gigas*, foi realizado, no trabalho de Deconto (2019), a quantificação dos transcritos em níveis basais de 19 isoformas em diferentes tecidos da ostra, podendo assim, ser confirmada a presença delas no organismo. A classe alfa foi identificada em duas sequências diferentes de GST no invertebrado, sendo elas denominadas *CgGSTA1.1* e *CgGSTA1.2*, e ambas tiveram sua prevalência basal semelhante em todos os tecidos, ou seja, elas estavam presentes na glândula digestiva, coração, músculos, palpos labiais, manto e brânquias das ostras *C. gigas* (DECONTO, 2019). Com isso, a isoforma *CgGSTA1.2* foi primeiramente escolhida para realização de estudos que a caracterizassem estruturalmente e funcionalmente, realizados no trabalho de Deconto (2022).

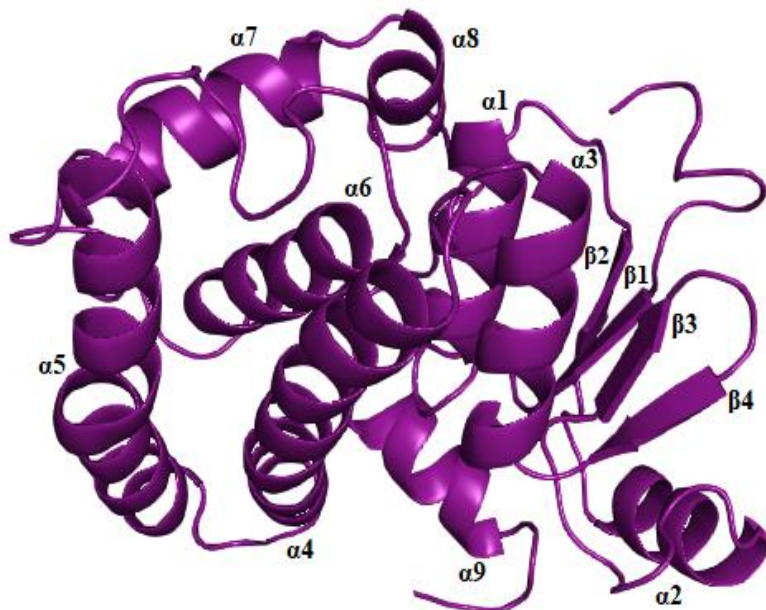
Modelos estruturais tridimensionais foram construídos computacionalmente para 16 das 24 sequências de GSTs identificadas em *C. gigas*, pois a partir destes modelos estruturais, com a predição de seus padrões de enovelamento e sítios de ligação, torna-se possível o estudo de propriedades e atividade destas enzimas.

Sendo assim, o modelo da isoforma *CgGSTA1.2*, que possui uma sequência de 225 aminoácidos, foi construído e avaliado como confiável segundo alguns parâmetros de confiabilidade e precisão global descritos no trabalho de Deconto (2022). Na Figura 1 podemos observar as estruturas secundárias da isoforma *CgGSTA1.2*, composta por 4 folhas- β e 9 α -hélices, sendo possível destacar a presença da α_9 , que é uma característica particular das GSTs da classe alfa (GUSTAFSSON *et al.*, 1999; DIRR; WALLACE, 1999). Já

na Figura 2 está representado o modelo em sua forma dimérica, onde a interação entre os monômeros acontece do modo "*lock-and-key*", como já se sabe que acontece com as GSTs das classes alfa, mu e pi, em que, geralmente, um resíduo de fenilalanina do domínio N-terminal de uma subunidade interage hidrofobicamente com um resíduo do domínio C-terminal da outra subunidade (SAYED; WALLACE; DIRR, 2000).

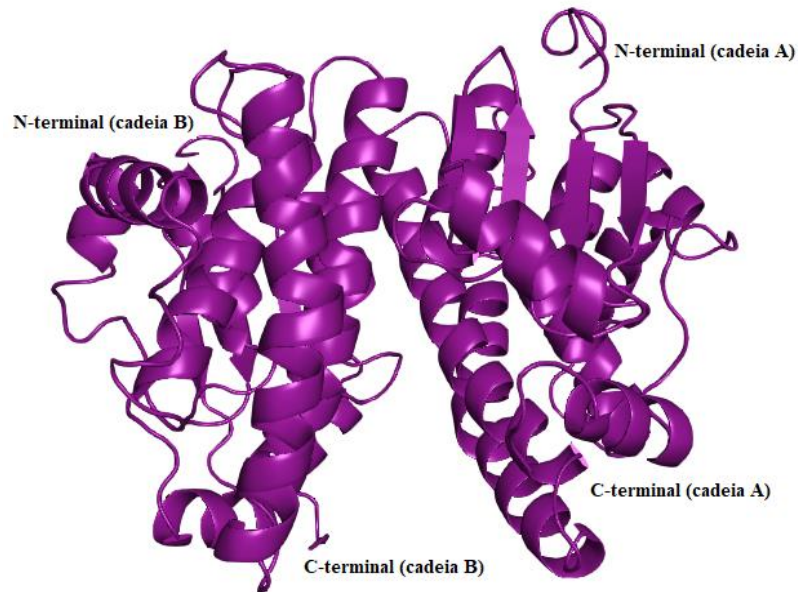
A partir da construção e validação do modelo estrutural da enzima, estudos de interação proteína-ligante, com possíveis substratos podem ser realizados computacionalmente também. Técnicas como o atracamento molecular, que podem ser realizadas por diversas plataformas e programas, predizem sítios e tipos de ligações não covalentes entre um receptor e seu ligante (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). Já as simulações de dinâmica molecular nos permitem um modelo de sistemas mais complexos, considerando mais aspectos biológicos das moléculas, como sua flexibilidade, interações em um meio com solvente, regulação de temperatura, além da presença de campos de forças que ajudam a prever a trajetória dos átomos em uma escala de tempo (VERLI, 2014). Ao fazer uso destas metodologias de forma combinada, busca-se cada vez mais simular sistemas biológicos a fim de solucionar problemáticas atreladas a eles de uma forma mais detalhada, rápida e preditiva.

Figura 1. Representação tridimensional do modelo monomérico da isoforma *CgGSTA1.2*, com suas estruturas secundárias identificadas e enumeradas.



Fonte: Elaborado pela autora no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019), a partir da predição do modelo criado por Deconto (2022).

Figura 2. Representação tridimensional do modelo dimérico da isoforma *CgGSTA1.2*, com suas duas cadeias identificadas.



Fonte: Elaborado pela autora no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019), a partir da predição do modelo criado por Deconto (2022).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar estruturalmente *in silico* a isoforma enzimática Glutathione *S*-transferase alfa 1.2 de ostra *Crassostrea gigas* através de sua interação com possíveis substratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as interações dos ligantes CDNB, 4-HNE e (+)-*anti*-BPDE no sítio ativo da estrutura modelada *CgGSTA1.2*.
- Avaliar a estabilidade do complexo receptor-ligante, apenas para o CDNB, suas energias de ligação e interações proteína-ligante em uma escala de tempo.

- Comparar as análises da simulação por dinâmica molecular, *in silico*, com os dados de cinética enzimática feitas com a isoforma *CgGSTA1.2* recombinante e o substrato CDNB, *in vitro*.

3 METODOLOGIA

3.1 ATRACAMENTO MOLECULAR PROTEÍNA-LIGANTE

Considerando o que se tem na literatura foi decidido testar a interação de nosso modelo proteico GSTA1.2 de *Crassostrea gigas*, com os seguintes substratos: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e (+)-*anti*-benzo[*a*]pireno diol epóxido ((+)-*anti*-BPDE), uma vez que esses demonstram ser importantes substratos para as GSTs da classe alfa. Um parâmetro definido pelo nosso grupo de pesquisa, para os testes de atracamento molecular, foi realizá-los com estruturas desses ligantes já conjugadas à GSH, uma vez que assim poderíamos avaliar a acomodação das moléculas nos sítios G e H da enzima simultaneamente, como deve ocorrer nos sistemas biológicos.

Para isso, foi realizada uma busca no PDB (<http://rcsb.org>) por estruturas cristalográficas de GSTs da classe alfa de outros organismos, que estivessem ligadas aos substratos de nosso interesse, conjugados à GSH. Sendo assim, as estruturas cristalográficas selecionadas foram: uma GST alfa de *Gallus gallus* (PDB:1vf3) para o substrato CDNB; uma GST alfa de *Mus musculus* (PDB:1b48) para o substrato 4-HNE e outra GST alfa de *Mus musculus* (PDB:1ml6) para o substrato (+)-*anti*-BPDE. Então, as estruturas dos ligantes foram separadas da estrutura proteica de origem e hidrogênios foram adicionados, usando o programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019), para que estes pudessem ser usados nos testes de atracamento.

Os ensaios de atracamento molecular foram realizados pelo programa EADock DSS (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011) através do portal <http://swissdock.ch>. Após adicionar os arquivos da proteína e do ligante, foram definidos alguns parâmetros, como o tamanho e a centralização da caixa de atracamento, o modo do atracamento e a flexibilidade para as cadeias laterais próximas ao ligante. Sendo assim, todas as caixas de atracamento tiveram o tamanho de 15x20x20 Å para o eixo X, Y e Z, respectivamente e foram centralizados no sítio catalítico de uma das subunidades das proteínas, utilizando a ferramenta de análise de superfície, Autodock Vina, do programa UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*,

2004), para obter as coordenadas. O modo de atracamento escolhido foi o *accurate*, com maior poder computacional envolvido e maior tempo de análise, ele gera modos de ligação mais precisos (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011). Já, a flexibilidade das cadeias laterais foi permitida para resíduos que estivessem até 3 Å de distância do ligante.

Além dos testes com cada um dos ligantes em nosso modelo estrutural, *CgGSTA1.2*, também foram realizados testes de *redocking*, ou seja, submetemos ao atracamento molecular as estruturas proteicas das estruturas cristalográficas com seus respectivos ligantes, para assim, avaliar a capacidade do programa de reproduzir as posições originais e comparar os resultados com as posições que obtivemos em nosso modelo estrutural. Com isso, um dos aspectos avaliados nesta etapa foi o valor de RMSD (Raiz do Desvio Quadrático Médio) do ligante, que se refere ao desvio espacial que a estrutura sofreu após passar pelo atracamento molecular, com base em sua posição original retirada da estrutura cristalográfica. As posições foram, primeiramente, avaliadas no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019) e os cálculos de RMSD foram feitos utilizando a plataforma *online* DockRMSD (<http://zhanggroup.org>) (BELL; ZHANG, 2019).

Um outro aspecto avaliado e comparado entre o atracamento dos ligantes com nosso modelo e os *redockings*, foram os valores da variação de energia livre de Gibbs (ΔG) dadas pelo próprio programa de atracamento para cada uma das posições encontradas. Os valores de ΔG , quando negativos, nos indicam que a reação irá liberar energia, já quando o ΔG é positivo, a reação precisa consumir energia do sistema para que ocorra. Sendo assim, sob condições dos sistemas biológicos que possuem pressão e temperatura constantes, o ΔG das reações que ocorrem espontaneamente sempre é negativo (NELSON; COX, 2019). Com isso, quanto mais negativos e próximos dos valores de ΔG dos *redockings*, que foram feitos com as estruturas cristalográficas, maior a tendência das posições do atracamento encontradas para os ligantes em nosso modelo acontecerem espontaneamente.

O último aspecto considerado nessa etapa do trabalho, foi a quantidade e a natureza das interações dos ligantes com os resíduos do sítio catalítico da enzima. Para avaliar esse aspecto, foi usado o programa LigPlot+ (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011), que nos forneceu diagramas 2D com as interações não covalentes entre proteína e ligante. Desta forma, comparamos o padrão de interação dos ligantes no sítio catalítico das estruturas cristalográficas, das quais foram retirados, com o que encontramos através do atracamento molecular com o nosso modelo, *CgGSTA1.2*.

3.2 DINÂMICA MOLECULAR ATOMÍSTICA

O melhor complexo proteína-ligante que obtivemos na etapa de atracamento molecular para o ligante CDNB em nosso modelo, *CgGSTA1.2*, foi analisado quanto à sua estabilidade, através da variação do comportamento molecular do complexo como função do tempo, em meio a uma solução aquosa, por meio de simulações de dinâmica molecular (DM) (VERLI, 2014). Para a realização da DM utilizamos o programa GROMACS 2021.3 (ABRAHAM *et al.*, 2015), seguindo como base o tutorial disponível no próprio site do programa (<http://mdtutorials.com>).

A descrição conformacional dada por uma simulação de DM é descrita pela física clássica, onde a temperatura do sistema fornece energia para que os átomos, com suas respectivas massas, sofram uma aceleração e mudem suas posições no espaço, fenômeno que é regido por campos de forças específicos, ou seja, por parâmetros de forças interatômicas e intermoleculares aplicados ao sistema (VERLI, 2014). O campo de força que utilizamos neste trabalho foi o CHARMM36, com a topologia do ligante sendo preparada através de um outro campo de força, CGenFF (VANOMMESLAEGHE *et al.*, 2009). O sistema foi envolto por uma caixa dodecaédrica, solvatado com moléculas de água e neutralizado com a adição de 150 mM de íons. Para que o sistema não apresentasse choques estéricos ou geometria inadequada, foi submetido a uma etapa de relaxamento através de uma minimização de energia. Depois, foi realizada uma etapa de equilibração, para que todo o sistema estivesse na temperatura de 27°C e pressão de 1 Atm (parâmetros ambientais), a fim de manter a orientação correta de seus componentes em relação à proteína e densidade adequada. Com todas as etapas de preparação concluídas, a simulação de DM foi realizada por 150 ns.

Além do complexo *CgGSTA1.2*-ligante (holo), foi realizada a simulação de DM também com a estrutura cristalográfica (PDB:1vf3) e para o modelo *CgGSTA1.2* sem ligante (apo), seguindo o mesmo protocolo descrito acima, com o intuito de tecer análises comparativas entre os três sistemas. Uma das análises foi o cálculo de RMSD (*backbone*) para o ligante, considerando o desvio espacial que a estrutura sofreu ao longo da simulação em relação à sua posição inicial no sítio catalítico da enzima, comparando a movimentação do ligante no sítio ativo do nosso modelo proteico, *CgGSTA1.2* e no sítio ativo da estrutura cristalográfica. Também avaliamos a variação das distâncias de átomos envolvidos em interações polares que julgamos importantes, encontradas na etapa de atracamento molecular,

durante todo o percurso da simulação de DM. O intuito foi verificar a estabilidade destas ligações e comparar com o que foi encontrado na estrutura cristalográfica.

Outra análise realizada, foi dos valores de RMSF (Raiz da Flutuação Quadrática Média) da proteína, com o intuito de verificar a flexibilidade dos resíduos de aminoácidos da proteína através da movimentação de seus carbonos- α (SILVA, 2018). Desta forma, comparamos além dos valores de RMSF de nosso modelo com o da estrutura cristalográfica PDB:1vf3, também os valores de RMSF da simulação de DM do modelo *CgGSTA1.2* com a presença do ligante GDN (holo) e sem a presença do ligante (apo) em seu sítio catalítico, para avaliar a influência do ligante na estabilidade da estrutura proteica.

Os cálculos de energia de ligação dos sistemas proteína-ligante foram feitos através do pacote gmx_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO *et al.*, 2021). Considerando que a ΔG de um sistema é composta por valores de variação de entalpia (ΔH) e de variação de entropia (ΔS), usamos apenas os valores de ΔH para expressar e comparar a energia dos sistemas. Uma vez que a entalpia representa o conteúdo de calor total, ela reflete a quantidade e a natureza das interações químicas envolvidas nas reações. Sendo assim, quanto menor o valor de ΔH , mais calor é liberado da reação, contribuindo para diminuir o ΔG , o que significa que o conteúdo de calor dos reagentes é maior que do produto, e que a reação está mais propensa a ocorrer espontaneamente (NELSON; COX, 2019). Utilizando o mesmo pacote gmx_MMPBSA foi realizado também a decomposição da contribuição entre resíduos do sítio catalítico para a energia de ligação, desta forma, apenas aminoácidos que estivessem a 4 Å do ligante foram considerados nessa análise.

4 RESULTADOS

4.1 ATRACAMENTO MOLECULAR COM OS LIGANTES DE INTERESSE

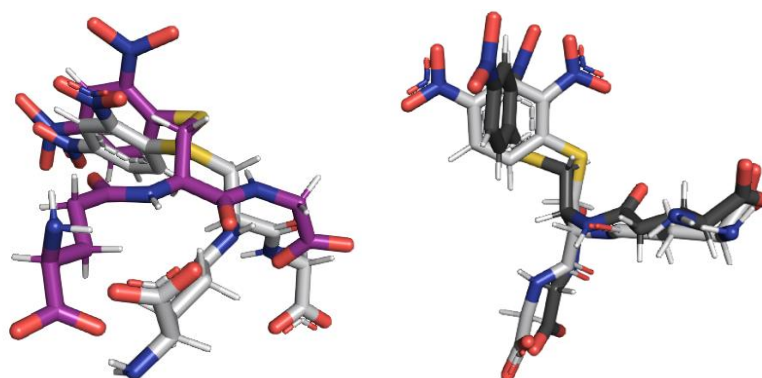
4.1.1 Ligação de *CgGSTA1.2* com GSH conjugada ao CDNB (GDN)

A partir do atracamento molecular realizado do nosso modelo estrutural de GST (*CgGSTA1.2*) com a molécula GDN (CDNB conjugado à GSH) foi possível escolher uma posição do ligante dentro do sítio catalítico de forma semelhante à estrutura cristalográfica (PDB:1vf3) a qual usamos como referência. Sendo assim, a posição escolhida apresentou um RMSD de 2.8 Å em relação a posição do ligante na estrutura cristalográfica de referência,

como mostrado na Figura 3. Como resultado desses atracamentos, encontramos valores de energia livre de -8,0 kcal/mol, o que indica que a ligação pode ocorrer espontaneamente (NELSON; COX, 2019).

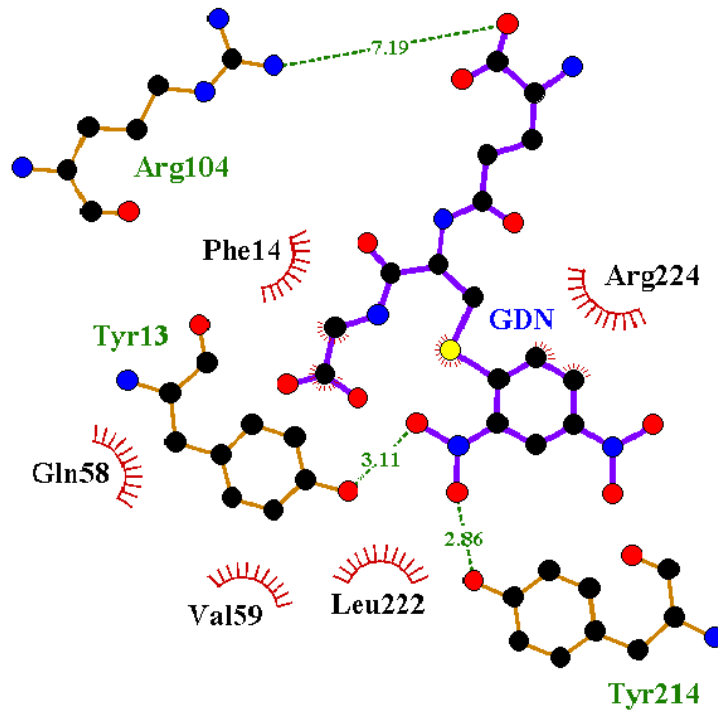
A fim de saber se a posição encontrada se aproxima da referência usada aqui como controle, retiramos o ligante de uma estrutura cristalográfica e fizemos o atracamento molecular da proteína e do ligante ambos pertencente à mesma estrutura, PDB:1vf3. Esse controle chamamos de *redocking*. Quando comparamos esses valores com o da melhor posição do *redocking* observamos que os valores, RMSD de 2.1 Å e energia livre de -9,2 kcal/mol, são bastante próximos, como mostrado na Tabela 1. Além disso, foram analisadas as interações dos ligantes com alguns aminoácidos do sítio catalítico de nosso modelo estrutural, e foi possível observar ligações de hidrogênio com a Y13, R104 e Y214, além de interações hidrofóbicas com a F14, V59, Q58, L222 e R224 (Figura 4). Quando comparamos com as interações que o GDN faz no sítio catalítico da estrutura cristalográfica, podemos observar que há algumas correspondências entre os aminoácidos como mostrado na Figura 5, dando destaque para a V59, Q58 e especialmente para a Y13, que é um aminoácido importante e bem conservado no sítio catalítico das GSTs da classe alfa (CAMERON *et al.*, 1995). Em ambos está fazendo uma ligação de hidrogênio com a parte de anel do conjugado, pertencente ao CDNB (Figura 5).

Figura 3. Sobreposição das posições do ligante GDN no modelo *CgGSTA1.2* (roxo) com a posição na estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza claro). E sobreposição das posições do ligante GDN no *redocking* feito com a estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza escuro) com a posição original tirada desta (cinza claro).



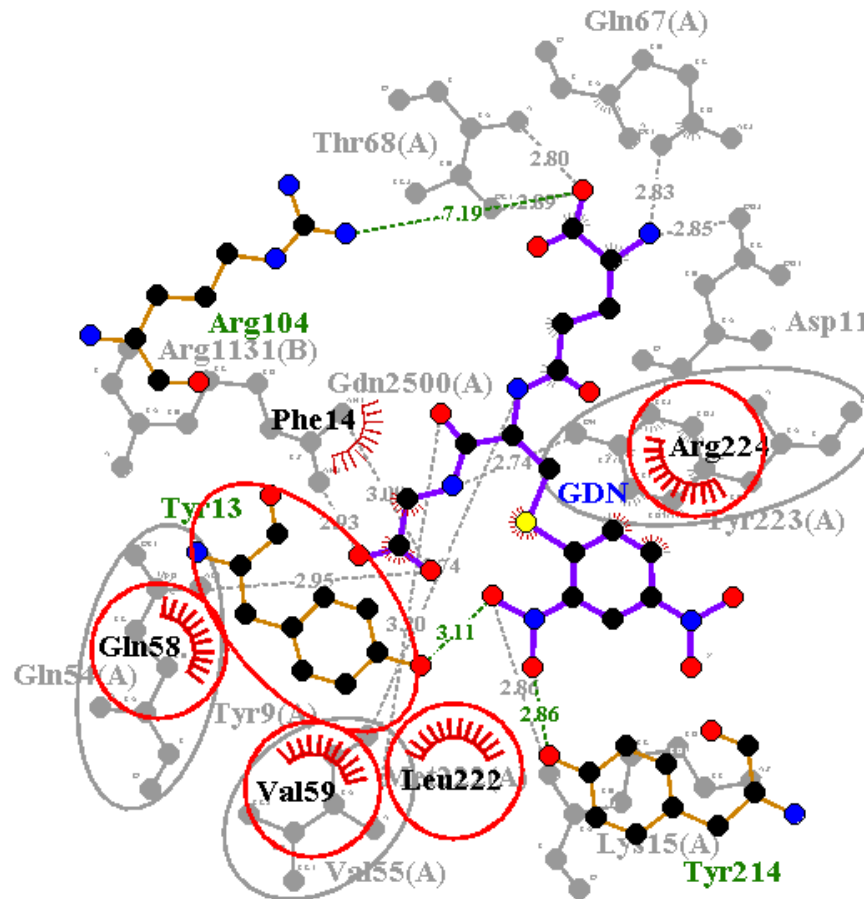
Fonte: Elaborado pela autora no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

Figura 4. Representação 2D das interações do ligante GDN no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*. Ligações de hidrogênio estão representadas em verde, com os aminoácidos Y13, R104 e Y214. Interações hidrofóbicas estão representadas em vermelho, com os aminoácidos F14, V59, Q58, L222 e R224.



Fonte: Elaborado pela autora no programa LigPlot (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

Figura 5. Representação 2D das interações do ligante GDN no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2* e da estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (em cinza ao fundo) sobrepostas. Os círculos em vermelho indicam as conservações de posição entre os resíduos de ambas as estruturas, calculadas pelo próprio *software* LigPlot.



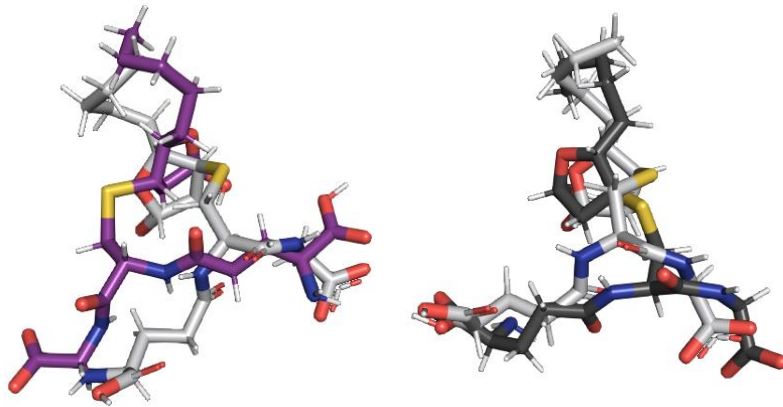
Fonte: Elaborado pela autora no programa LigPlot (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

4.1.2 Ligação de CgGSTA1.2 com GSH conjugada ao 4-hidroxinonenal (HAG)

Para avaliar a interação do modelo estrutural da proteína CgGSTA1.2 com o substrato 4-HNE analisamos os resultados do atracamento molecular feito com essa molécula conjugada a GSH, aqui chamado de HAG, semelhante ao realizado para o CDNB. Escolhemos também uma posição em que o ligante estivesse ocupando o sítio ativo da proteína de forma semelhante ao da estrutura cristalográfica que usamos como referência, neste caso a PDB:1b48. A posição escolhida apresentou um RMSD de 5.4 Å em relação à posição do ligante no cristal, como mostrado na Figura 6, e energia livre de -9,5 kcal/mol (Tabela 1). O valor mais alto de RMSD nos mostra que não foi possível reproduzir a posição do ligante na estrutura cristalográfica de referência, especialmente quando comparamos com os valores obtidos para o *redocking* que apresentou valor de energia livre -11,9 kcal/mol e RMSD de 2.0 Å (Tabela 1), bem distante do obtido para o nosso modelo. Entretanto, o valor negativo de energia livre nos indica que ainda assim é uma ligação provável de acontecer espontaneamente, porém em uma posição distinta da estrutura usada como controle.

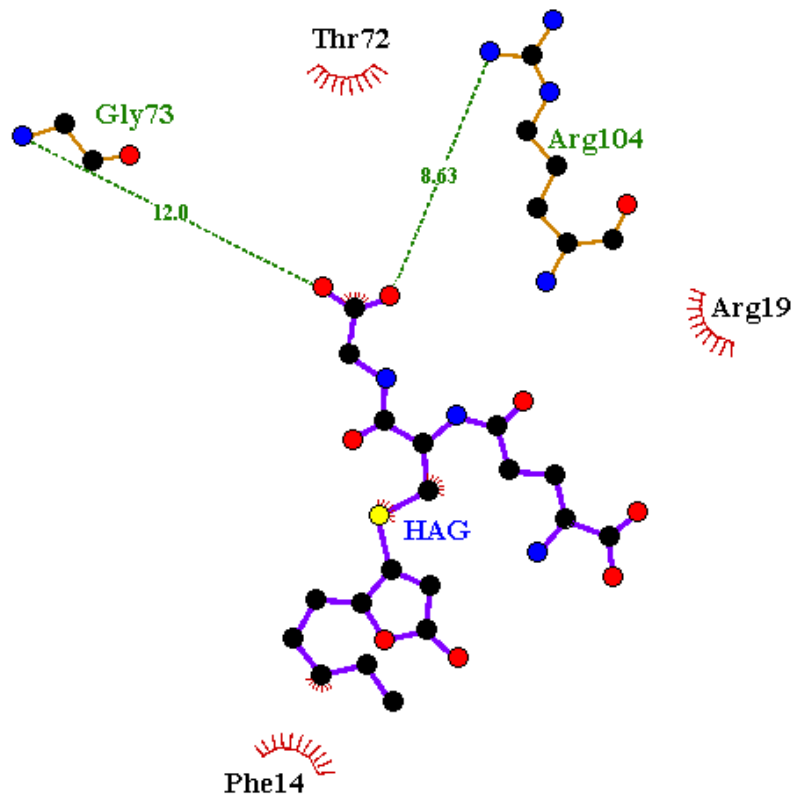
A partir dessa posição de baixa energia foi avaliada a interação do ligante com alguns aminoácidos do sítio catalítico no modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*. Ligações de hidrogênio foram observadas com os resíduos G73 e R104, e interações hidrofóbicas com os resíduos F14, R19 e T72 (Figura 7). Ao compararmos com as interações que a HAG faz no sítio catalítico da estrutura cristalográfica de referência, vemos que há apenas uma correspondência com as interações do ligante em nosso modelo estrutural, que acontece no resíduo T72, contudo, na estrutura cristalográfica, essa treonina interage com o ligante por ligação de hidrogênio e em nosso modelo aparece como uma interação hidrofóbica (Figura 8).

Figura 6. Sobreposição das posições do ligante HAG no modelo *CgGSTA1.2* (roxo) com a posição na estrutura cristalográfica PDB:1b48 (cinza claro). E sobreposição das posições do ligante HAG no *redocking* feito com a estrutura cristalográfica PDB:1b48 (cinza escuro) com a posição original tirada desta (cinza claro).



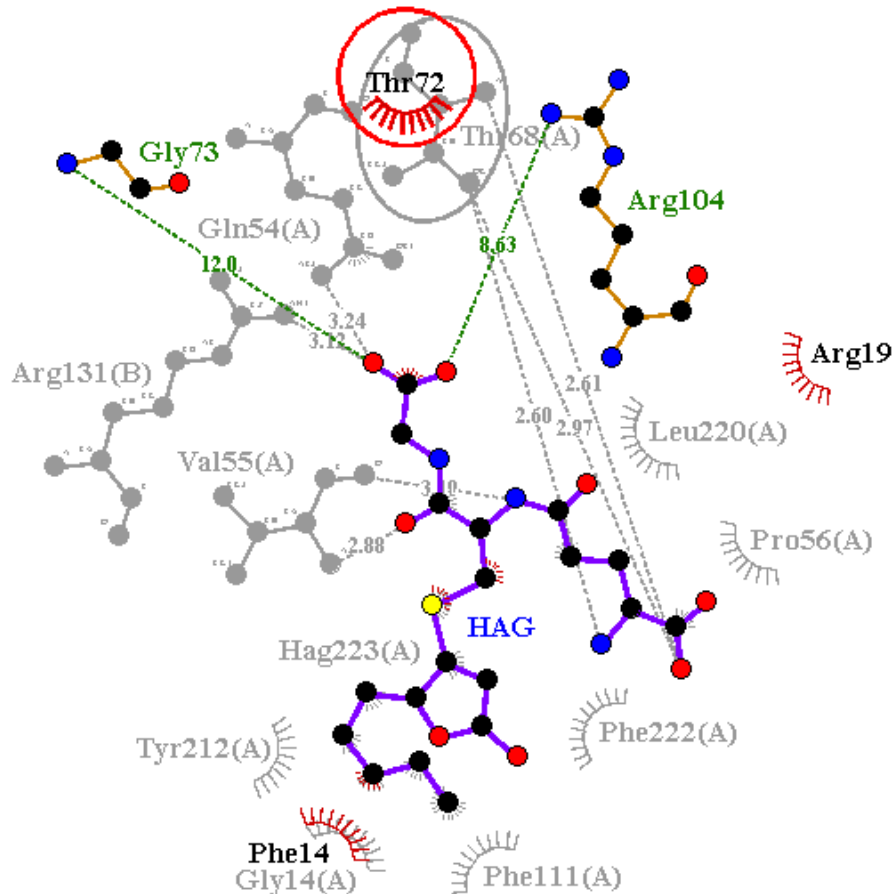
Fonte: Elaborado pela autora no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

Figura 7. Representação 2D das interações do ligante HAG no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*. Ligações de hidrogênio estão representadas em verde, com os aminoácidos G73 e R104. Interações hidrofóbicas estão representadas em vermelho, com os aminoácidos F14, R19 e T72.



Fonte: Elaborado pela autora no programa LigPlot (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

Figura 8. Representação 2D das interações do ligante HAG no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2* e da estrutura cristalográfica PDB:1b48 (em cinza ao fundo) sobrepostas. Os círculos em vermelho indicam as conservações de posição entre os resíduos de ambas as estruturas, calculadas pelo próprio *software* LigPlot.



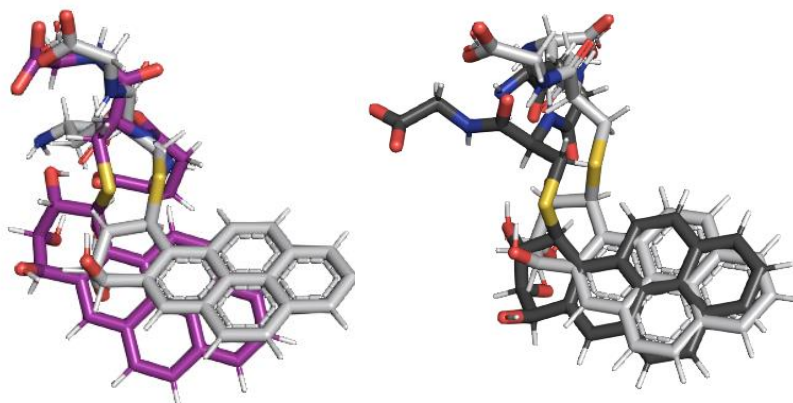
Fonte: Elaborado pela autora no programa LigPlot (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

4.1.3 Ligação de CgGSTA1.2 com GSH conjugada ao (+)-anti-BPDE (GBX)

O resultado do atracamento da molécula de (+)-anti-BPDE conjugada a GSH (aqui chamada de GBX) com CgGSTA1.2 foi comparado à posição do ligante na estrutura cristalográfica PDB:1ml6. A posição mais próxima que obtivemos dessa estrutura referência teve um RMSD de 3.3 Å (Figura 9), e sua energia livre de interação foi de -11,2 kcal/mol. Esses valores foram comparáveis aos obtidos no *redocking* realizado com a estrutura cristalográfica, no qual obtivemos um valor de RMSD de 2,5 Å e energia livre de -9,8 kcal/mol, como pode ser visto na Tabela 1. Apesar do RMSD ter sido um pouco mais alto, a energia de interação de GBX com o nosso modelo foi mais baixa que a encontrada na melhor posição do *redocking*, como pode ser visto na Tabela 1, sugerindo ser bastante favorável. Também foi observado que o ligante GBX interagiu no sítio catalítico do nosso modelo estrutural da proteína CgGSTA1.2 através de ligações de hidrogênio com os aminoácidos K57, Q58 e V59 e de interações hidrofóbicas com os aminoácidos R19, L111, F115, L222 e R224 (Figura 10). Quando comparamos com as interações do ligante na

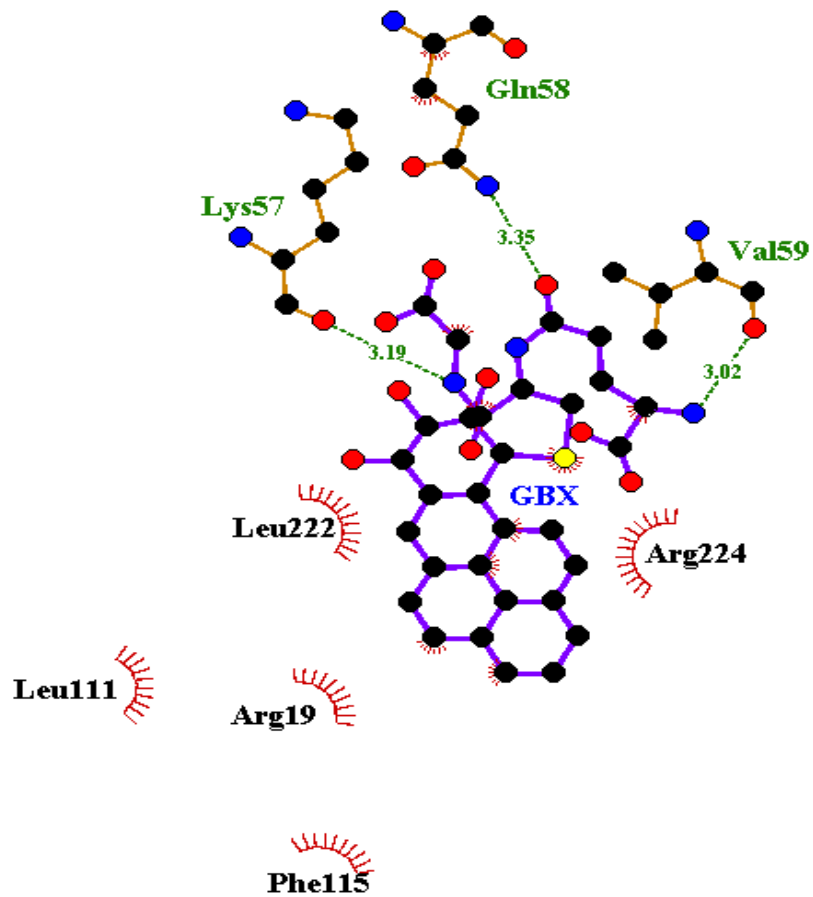
estrutura cristalográfica, vemos que há correspondências entre quatro aminoácidos, como mostrado na Figura 11. Um destaque deve ser dado para os resíduos Q58 e V59 que também aparecem interagindo com o ligante GDN em nosso modelo *CgGSTA1.2* e possuem correspondências nas estruturas cristalográficas (PDB:1vf3 e PDB:1ml6) usadas como parâmetros de comparação para ambos ligantes.

Figura 9. Sobreposição das posições do ligante GBX no modelo *CgGSTA1.2* (roxo) com a posição na estrutura cristalográfica PDB:1ml6 (cinza claro). E sobreposição das posições do ligante GBX no *redocking* feito com a estrutura cristalográfica PDB:1ml6 (cinza escuro) com a posição original tirada desta (cinza claro).



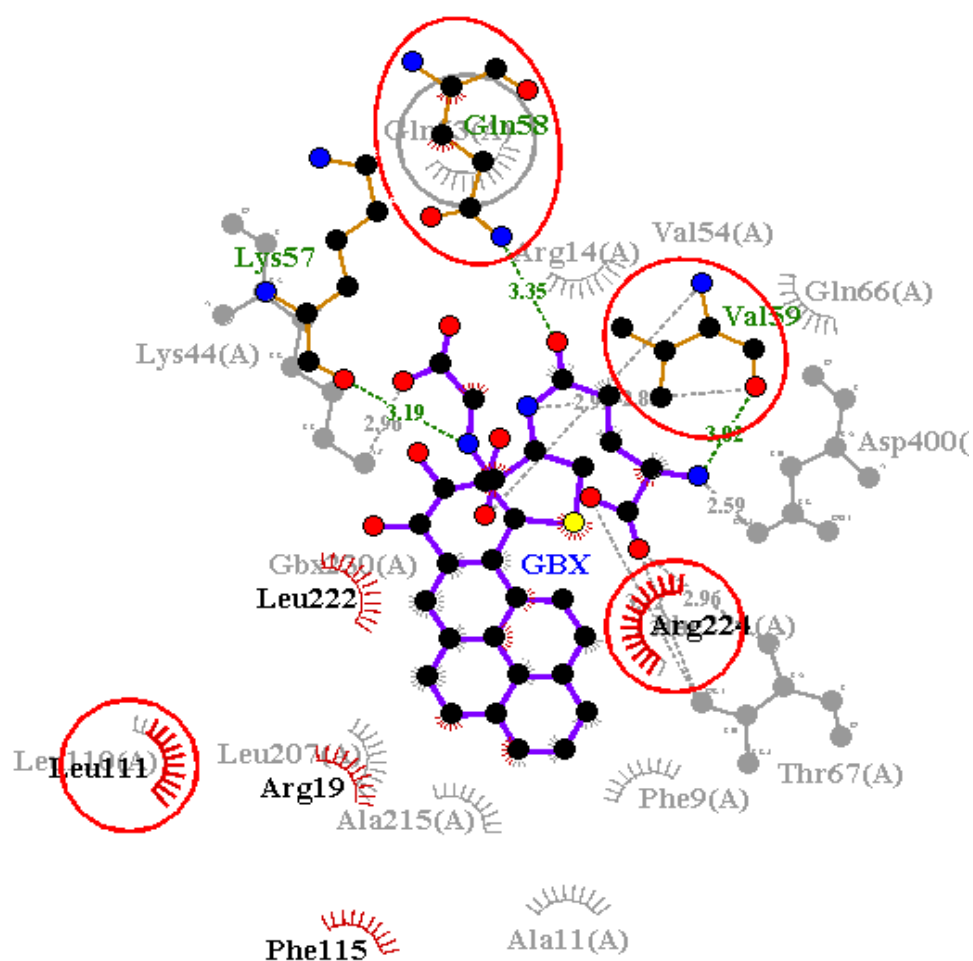
Fonte: Elaborado pela autora no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

Figura 10. Representação 2D das interações do ligante GBX no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*. Ligações de hidrogênio estão representadas em verde, com os aminoácidos K57, Q58 e V59. Interações hidrofóbicas estão representadas em vermelho, com os aminoácidos R19, L111, F115, L222 e R224.



Fonte: Elaborado pela autora no programa LigPlot (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

Figura 11. Representação 2D das interações do ligante GBX no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2* e da estrutura cristalográfica PDB:1ml6 (em cinza ao fundo) sobrepostas. Os círculos em vermelho indicam as conservações de posição entre os resíduos de ambas estruturas, calculadas pelo próprio *software* LigPlot.



Fonte: Elaborado pela autora no programa LigPlot (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

Tabela 1. Valores de RMSD e de energia livre das melhores posições do ligante encontradas através do atracamento molecular com o modelo estrutural *CgGSTA1.2* e com os cristais usados como controles positivos.

	RMSD (Å)	ΔG (kcal/mol)
CgGSTA1.2 - GDN	2.8	-8
Cristal (1vf3) - GDN	2.1	-9,2
CgGSTA1.2 - HAG	5.4	-9,5
Cristal (1b48) - HAG	2.0	-11,9
CgGSTA1.2 - GBX	3.3	-11,2
Cristal (1ml6) - GBX	2.5	-9,8

4.2 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR COM O LIGANTE CDNB

Avaliar a simulação da dinâmica molecular pode fornecer dados mais precisos sobre as interações, uma vez que utilizamos a molécula em caixa de água e acompanhamos o dinamismo das moléculas e suas respectivas interações ao longo do tempo (VERLI, 2014). Escolhemos o ligante CDNB por ser um clássico metabólito de GSTA em vertebrados (EATON; BAMMLER 1999; KONISHI *et al.*, 2005). O objetivo foi verificar se as interações com a proteína de ostra são de fato favoráveis ao longo do tempo como apontam os resultados de atracamento molecular.

Após realizar a simulação de dinâmica molecular do nosso modelo proteico com a molécula de GDN, a primeira análise feita foi do RMSD do ligante ao longo de toda trajetória, ou seja, ao longo do tempo analisado. Como mostrado na Figura 12, podemos observar que durante os 80 ns de trajetória iniciais, o ligante mantém sua posição relativamente estável no sítio catalítico da proteína *CgGSTA1.2*. Nos 40 ns seguintes, no entanto, ocorre uma movimentação maior e próximo dos 30 ns finais de simulação, o GDN encontra outra posição de maior estabilidade no sítio catalítico de nosso modelo. Sendo assim, a Tyr 13 que antes interagiu com a parte do anel aromático do CDNB, nesta nova conformação, passa a interagir com a cadeia alifática da GSH (Figura 13). Ligações com outras duas tirosinas são observadas, e com um aspartato da outra cadeia também, o anel do CDNB não parece estabelecer ligações de hidrogênio com nenhum resíduo.

O RMSD da posição final do ligante após a simulação de DM, em comparação a sua posição inicial, selecionada na etapa de atracamento, foi de 6.2 Å (0.62 nm) e está representada na Figura 14. Já quando observamos o ligante no sítio catalítico da estrutura cristalográfica que usamos como controle, percebemos que sua movimentação foi bem menor e se manteve estável durante toda a trajetória de 150 ns. O RMSD da posição final do ligante após a simulação de DM, em comparação a posição inicial, foi de 1.8 Å (0.18 nm) para a estrutura cristalográfica (Figura 14).

Figura 12. Gráfico do RMSD da posição do ligante GDN no sítio de ligação do modelo proteico *CgGSTA1.2* (roxo) e da estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza), durante a trajetória de 150 ns em simulação de dinâmica molecular atomística.

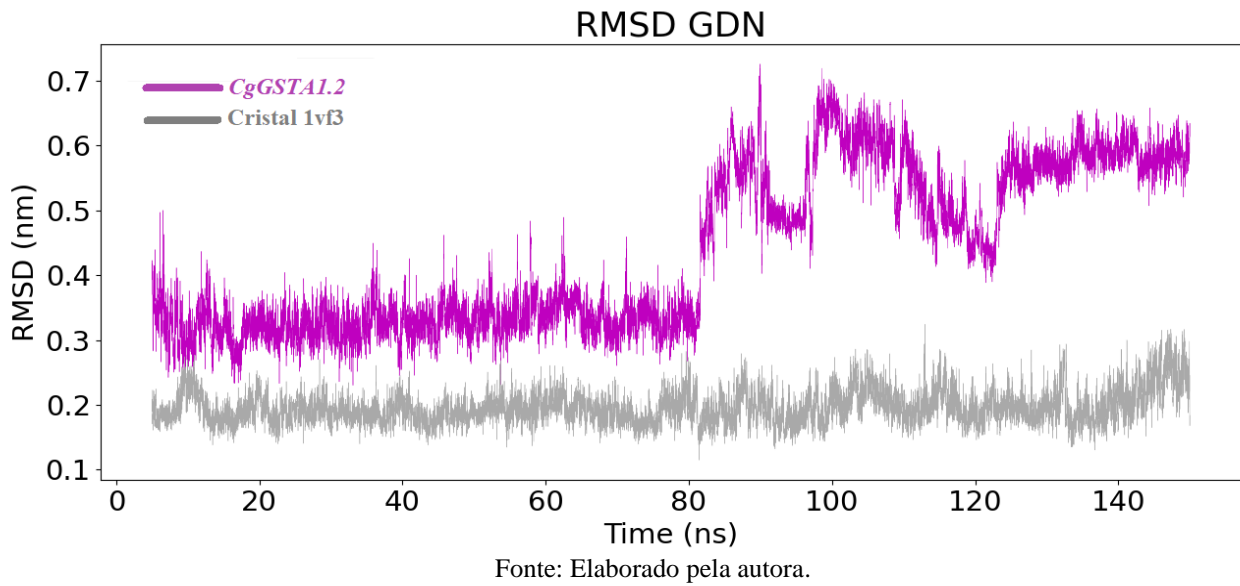
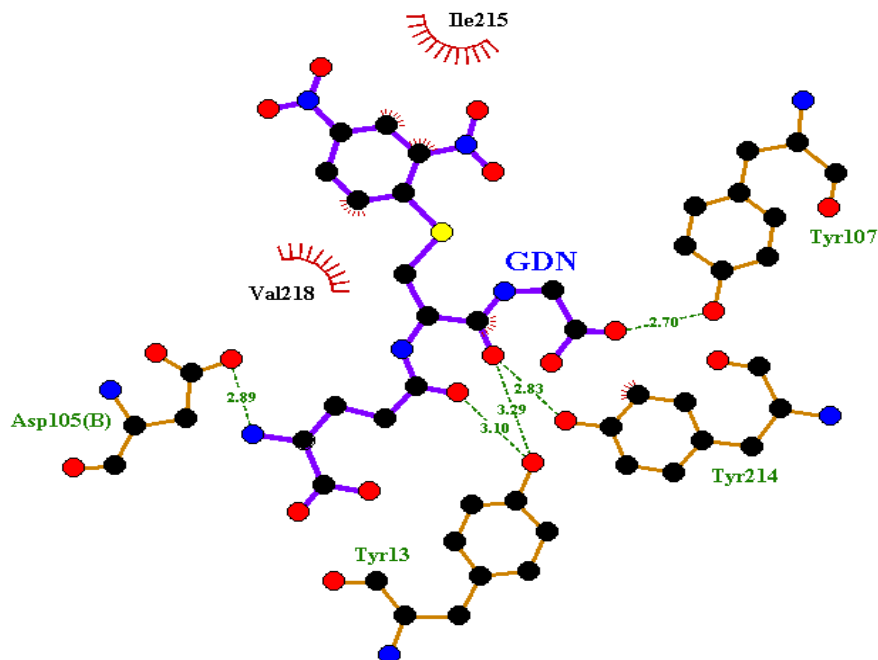
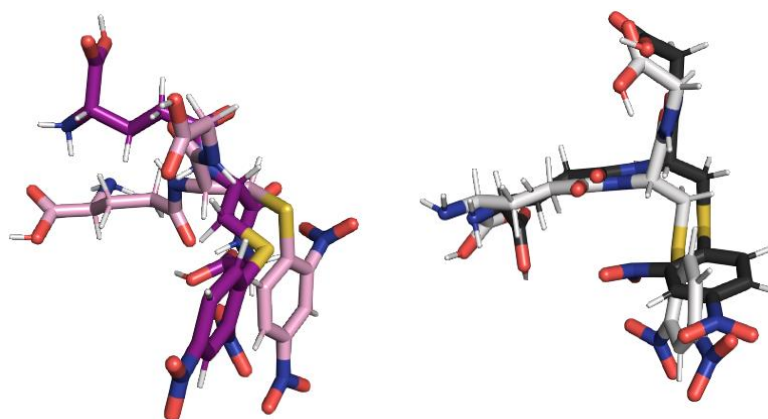


Figura 13. Representação 2D das interações do ligante GDN no sítio catalítico do modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*, após 150 ns de trajetória em simulação de dinâmica molecular atomística. Ligações de hidrogênio estão representadas em verde, com os aminoácidos Y13, Y107, Y214 e D105(B). Interações hidrofóbicas estão representadas em vermelho, com os aminoácidos I215 e V218.



Fonte: Elaborado pela autora no programa LigPlot (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

Figura 14. Sobreposição das posições iniciais e finais da simulação de dinâmica molecular para o ligante GDN no modelo *CgGSTA1.2* (roxo) e na estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza). As posições do início da trajetória estão representadas em roxo e cinza claro, enquanto as posições finais, após 150 ns de simulação, estão representadas em roxo e cinza escuro.

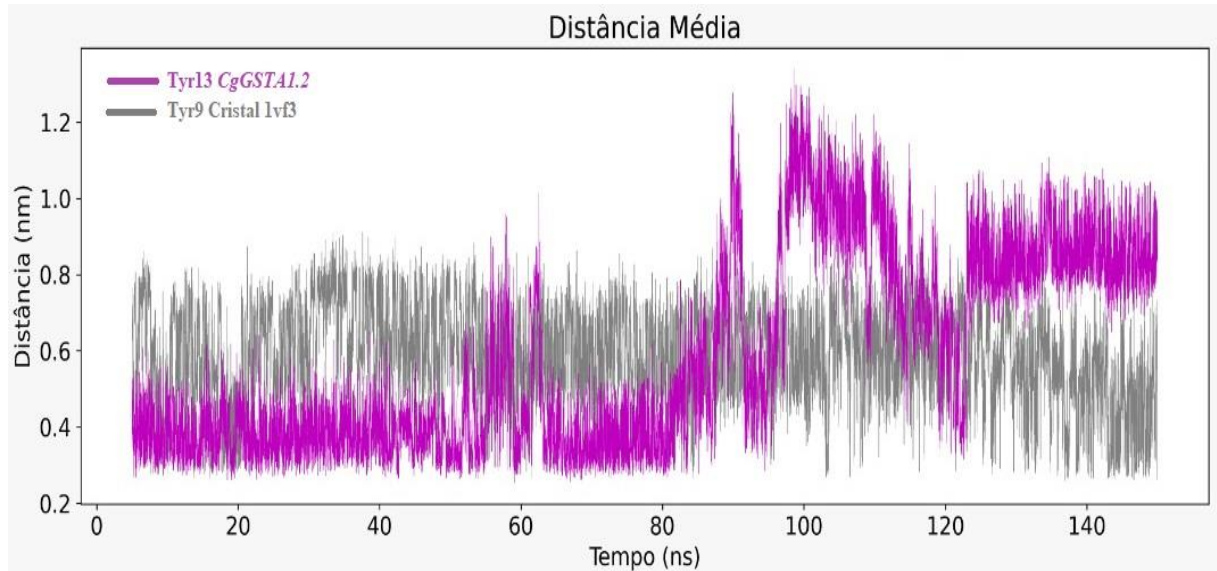


Fonte: Elaborado pela autora no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

Como mostrado na Figura 12, nos primeiro 80 ns de simulação de DM com nosso modelo, o ligante apresenta uma menor movimentação dentro do sítio catalítico e se mantém mais próximo de sua posição inicial. Sendo assim, resolvemos analisar a ligação de hidrogênio que a Tyr 13 faz com o anel aromático do ligante, visto que, essa ligação também acontece na estrutura cristalográfica que usamos como referência, e que esse resíduo é bem conservado no sítio catalítico das GSTs da classe alfa no geral (CAMERON *et al.*, 1995).

A Figura 15 mostra, para os complexos do modelo *CgGSTA1.2*-GDN e estrutura experimental PDB:1vf3-GDN, a variação da distância que os átomos doadores e aceptores de elétrons, envolvidos na interação polar, estão um do outro. Podemos observar que, para o complexo do modelo *CgGSTA1.2*-GDN, nos primeiros 50 ns, essa distância se mantém variando de 2 Å até 6 Å, depois disso, a distância e sua variação tende a aumentar no sistema. Quando comparamos com a estrutura cristalográfica, na qual, o ligante se movimenta bem menos no sítio catalítico, de acordo com os dados de RMSD (Figura 12), observamos que a distância dos átomos doadores e aceptores de elétrons da ligação de hidrogênio, entre a Tyr9 e o ligante, é alta durante toda a trajetória de DM, e apesar de constante, tampouco poderia configurar uma interação polar com alta ocupância.

Figura 15. Gráfico da variação da distância entre os átomos doadores e aceptores de elétrons na ligação de hidrogênio entre o resíduo de tirosina e o ligante, durante os 150 ns de trajetória de dinâmica molecular para o modelo *CgGSTA1.2* (roxo) e para a estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (cinza).



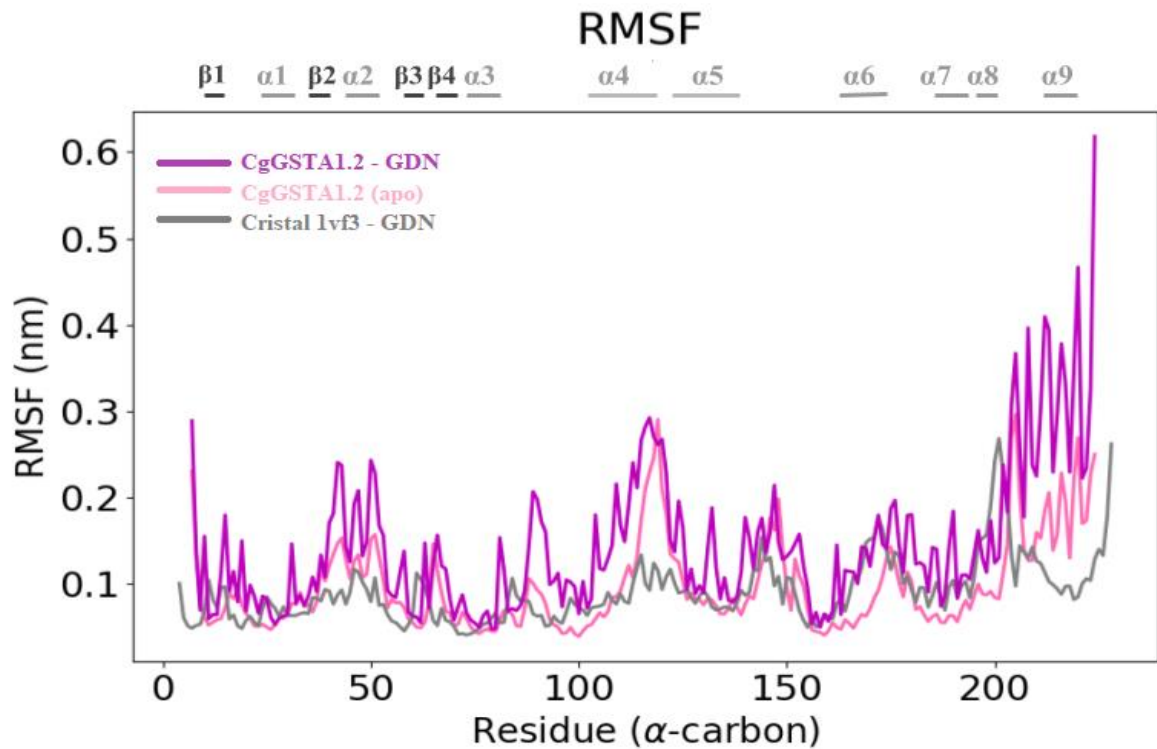
Fonte: Elaborado pela autora.

A terceira análise realizada foi do RMSF da cadeia A das proteínas, a qual interage com o ligante (Figura 16). O RMSF mede a flutuação da cadeia principal da proteína medida via carbono central alfa de cada aminoácido. Essa análise foi feita comparando o modelo em seu estado apo (sem ligante) e holo (com ligante), assim como, com a estrutura cristalográfica PDB:1vf3 (holo). Como o nosso modelo *CgGSTA1.2* possui regiões de loop em sua extremidade C-terminal, que não compõem o sítio catalítico da enzima, mas que movimentaram bastante durante a simulação, mais de 10 Å (1 nm), para essa análise, esses resíduos foram excluídos.

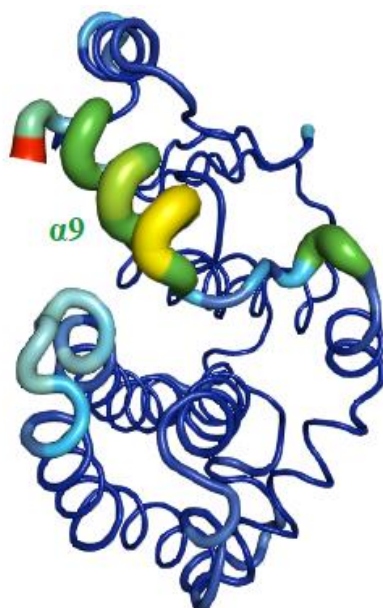
Comparando o RMSF do nosso modelo e da estrutura cristalográfica (Figura 16), podemos observar que os resíduos do modelo, em geral, se movimentam mais durante a trajetória de DM que os resíduos da estrutura cristalográfica, especialmente na região da α -hélice 9, pode-se observar melhor essa diferença. Considerando que a hélice $\alpha 9$ é uma parte bastante móvel das estruturas das GSTs da classe alfa, e que tende a se estabilizar com a presença de um ligante, ajudando na acomodação deste no sítio catalítico (GUSTAFSSON *et al.*, 1999; DIRR; WALLACE, 1999), fizemos uma comparação da movimentação dos resíduos de nosso modelo *CgGSTA1.2* em seu estado apo e holo (Figura 16). Entretanto, percebemos que na ausência do ligante, em geral, a proteína movimentou menos. A região da $\alpha 9$, que

pareceu se movimentar mais com presença do ligante no modelo, contrasta com o observado para a estrutura cristalográfica, a qual apresenta movimentação baixa (Figura 17).

Figura 16. Gráfico de RMSF da estrutura proteica do modelo *CgGSTA1.2*, durante as trajetórias de 150 ns nas simulações de dinâmica molecular atomística com a presença do ligante GDN (roxo) e sem a presença do ligante (rosa). E também da trajetória com a estrutura proteica cristalográfica PDB:1vf3 na presença do ligante GDN (cinza). Embaixo, uma representação 3D da movimentação dos resíduos do modelo *CgGSTA1.2* durante a trajetória de dinâmica molecular com a presença do ligante GDN, quanto maior a movimentação, mais quentes as cores e mais largo é representada a linha da cadeia principal da proteína.



Fonte: Elaborado pela autora



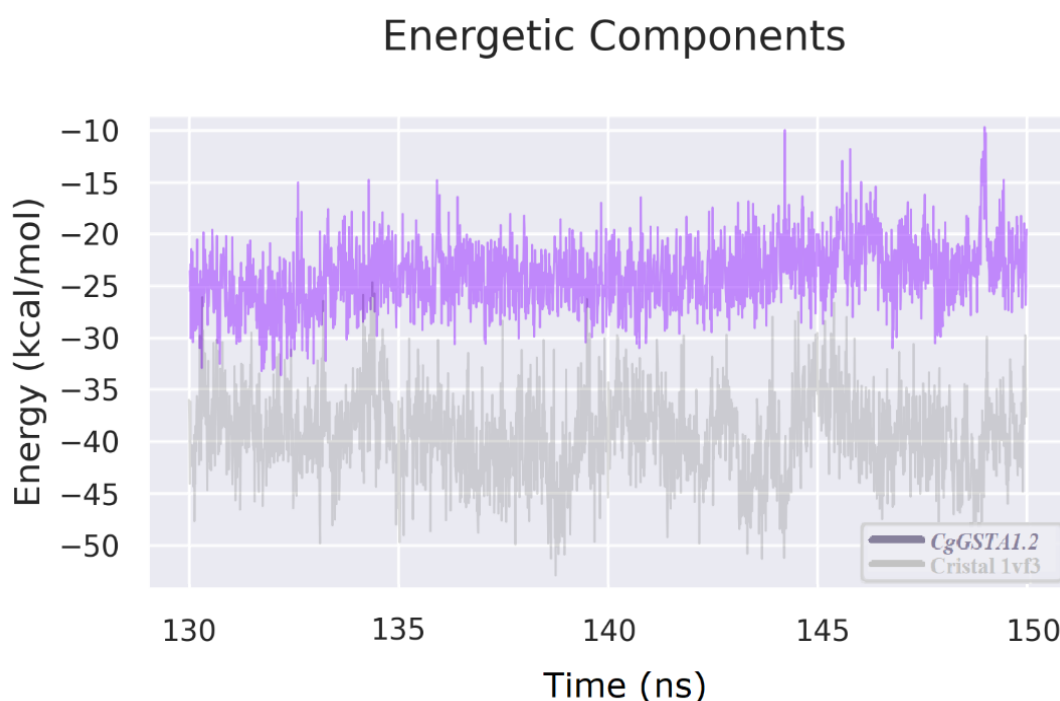
Fonte: Elaborado pela autora no programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2019).

O cálculo de energia livre dos sistemas foi realizado para os 20 ns finais da simulação, visto que foi apenas neste intervalo de tempo que o ligante GDN voltou a assumir uma posição de maior estabilidade no sítio catalítico do modelo proteico *CgGSTA1.2*, como pode ser observado pelo gráfico de RMSD do ligante (Figura 12). Em outros trabalhos de DM, também foi utilizado este critério para estabelecer o melhor intervalo de tempo para o cálculo de energias (Li *et al.*, 2015).

Desta forma, como podemos observar na Figura 17, a média dos valores de energia para o complexo do nosso modelo com o ligante foi de -23,97 kcal/mol, um pouco mais alta que para a estrutura cristalográfica que usamos como controle, que foi de -39,06 kcal/mol. A partir dos valores da energia total para os complexos, foi realizada também a decomposição da contribuição individual de energia de cada resíduo de aminoácidos nas proximidades do ligante, como mostrado na Figura 18. Em nosso modelo estrutural de GSTA1.2 de *C. gigas*, dez aminoácidos contribuíram para a interação proteína-ligante. Os resíduos Y13, R19 e Y214 foram os que apresentaram menor valor de energia, provavelmente contribuindo para a manutenção do complexo proteína-ligante através de ligações de hidrogênio com a parte da GSH do conjugado. Identificamos ligações de hidrogênio com esses resíduos ao analisar o complexo no tempo final de simulação, como apresentado no diagrama da Figura 13. O resíduo V218 está representado no diagrama interagindo com o anel aromático do CDNB hidrofobicamente, e na decomposição de energia ele também aparece contribuindo para a manutenção do complexo proteína-ligante.

Dentre todos os resíduos identificados na análise de decomposição como responsáveis pela diminuição da energia do sistema *CgGSTA1.2*-GDN, sete são conservados e também estão presentes como contribuintes na decomposição de energia para o sistema da estrutura cristalográfica PDB:1vf3. Em nosso modelo esses resíduos são: Y13, R19, Q58, P60, T72, L111 e F115 (Figura 19).

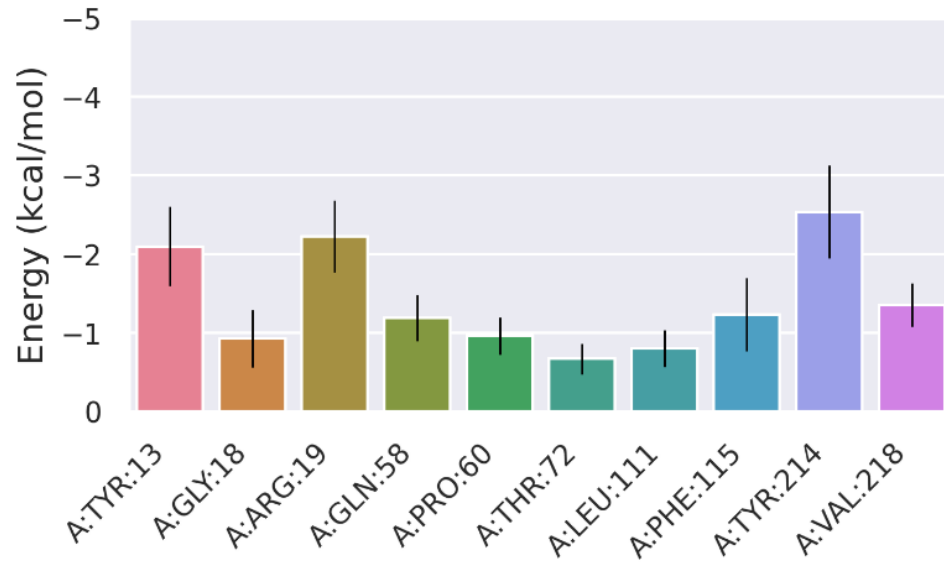
Figura 17. Gráfico da variação de energia livre de ligação dos sistemas *CgGSTA1.2*-GDN (roxo) e estrutura cristalográfica PDB:1vf3-GDN (cinza), durante os 20 ns finais das trajetórias de dinâmica molecular atomística. Considerando apenas as contribuições entálpicas.



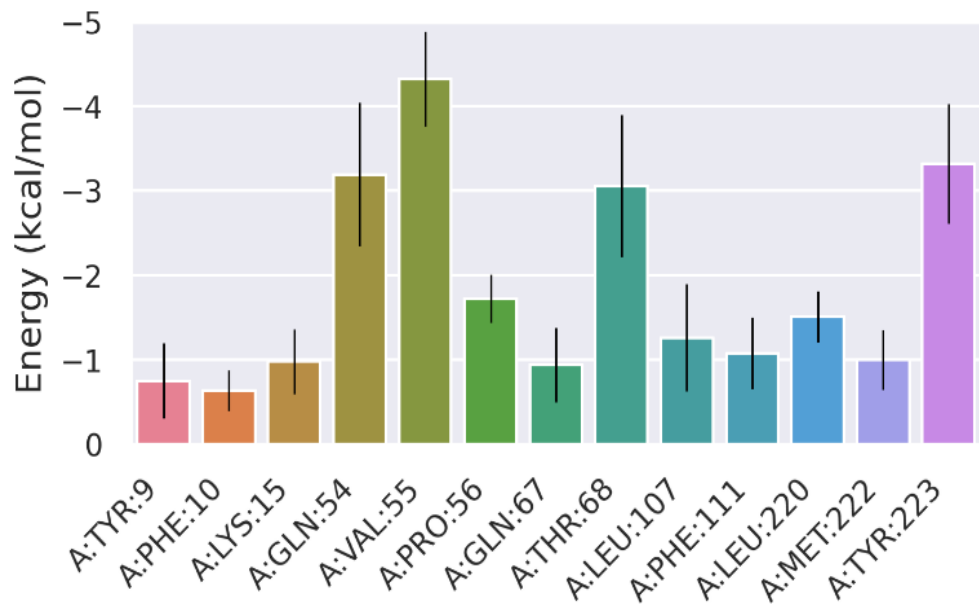
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18. Gráficos da contribuição dos resíduos para a energia livre de ligação proveniente da análise de decomposição de energia para os 20 ns finais da trajetória de dinâmica molecular atomística. (A) Decomposição de energia para o complexo *CgGSTA1.2*-GDN. (B) Decomposição de energia para o complexo estrutura cristalográfica PDB:1vf3-GDN, que foi usado como controle positivo.

A Energetic Components [Per-residue]

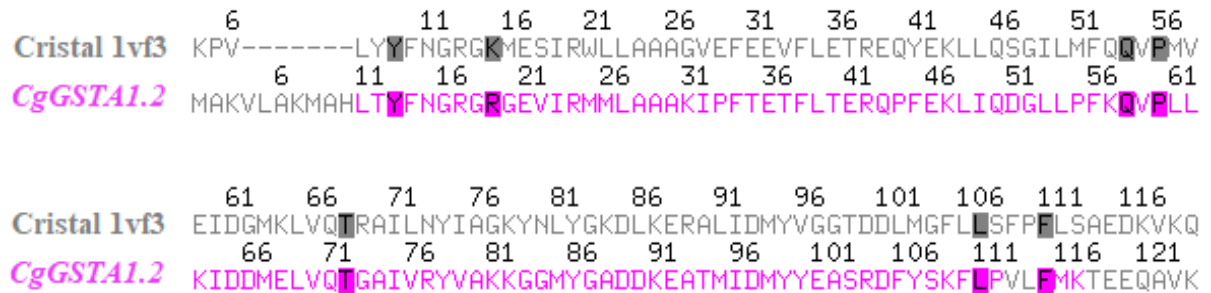


B Energetic Components [Per-residue]



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 19. Alinhamento das sequências de GST alfa de *Gallus gallus* (estrutura cristalográfica PDB:1vf3) em cinza, com a sequência de GST alfa1.2 de *Crassostrea gigas* em rosa. Com destaque para os resíduos conservados e que são responsáveis pela estabilidade do complexo proteína-ligante em ambas estruturas.



Fonte: Elaborado pela autora

5 DISCUSSÃO

Na dissertação de mestrado de Deconto (2022), que foi realizada em paralelo a este trabalho, dados de atividade e cinética enzimática foram obtidos para a proteína *CgGSTA1.2* recombinante e purificada, com os substratos CDNB e GSH, afim de avaliar funcionalmente e *in vitro* a capacidade de conjugação da enzima. Desta forma, seus dados mostraram que a isoforma de GST alfa1.2 de ostra *C.gigas* foi capaz de conjugar o CDNB à GSH com uma atividade específica de 654,53 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, um K_m de 5,627 mM e V_{max} de 6547 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (DECONTO, 2022). O K_m (constante de Michaelis) é a concentração de substrato necessária para que metade da velocidade máxima da reação seja atingida e o V_{max} é a velocidade máxima da reação, a qual não mudará mais significativamente com o aumento de substrato (NELSON; COX, 2019). Ambos valores são parâmetros cinéticos usados para demonstrar a atividade de enzimas para substratos específicos.

Esperando encontrar resultados estruturais que pudessem explicar e detalhar essa interação proteína-ligante no sítio catalítico da enzima, partimos de um modelo estrutural da proteína *CgGSTA1.2*, para simulações de atracamento e dinâmica molecular, com o ligante de interesse, o GDN. Desta forma, decidimos comparar nossos resultados com aqueles obtidos também para uma estrutura de GST alfa resolvida por cristalografia juntamente com o ligante.

A única estrutura encontrada no Banco de Dados de Proteínas (PDB) ligada ao GDN, foi a GSTA1.1 de *Gallus gallus* (PDB:1vf3) depositada por LIN *et al.*, (2005), porém nenhum artigo foi publicado ainda e nenhum dado se tem sobre a atividade e cinética enzimática dessa isoforma, em específico, para tecer comparações dessa natureza. Com isso, decidimos usar a estrutura cristalográfica PDB:1vf3 apenas como um referencial estrutural para o ligante no sítio catalítico do modelo *CgGSTA1.2*.

Através do atracamento molecular buscamos testar a reprodução *in silico* da orientação, dos valores de energia livre e dos tipos de interações do ligante no modelo proteico. Nossos resultados mostraram que foi possível reproduzir a posição do ligante em nosso modelo com um desvio de $2\text{\AA} < \text{RMSD} < 3\text{\AA}$, sendo comparável ao que foi obtido para *redocking* com a estrutura cristalográfica. Um dos critérios mais relevantes que usamos nesta etapa foi a interação com o resíduo de tirosina. Este resíduo é conservado no sítio catalítico das GSTs da classe alfa, uma vez que ele (Y9) aparece interagindo por ligação de hidrogênio com o anel do CDNB na estrutura cristalográfica (PDB:1vf3), e por já ser bem elucidado na literatura sua importância para a estabilização da GSH no sítio G dessas enzimas (CAMERON *et al.*, 1995). Sendo assim, é um forte candidato à também ser relevante na hora de orientar o conjugado no sítio catalítico em *C. gigas*.

Muitas outras posições encontradas pelo atracamento molecular tiveram valores de energia livre menores, então, com o intuito de verificar a estabilidade do ligante na posição escolhida, submetemos o complexo a uma trajetória de simulação de dinâmica molecular por 150 ns. O que observamos foi que durante os 80 ns iniciais o ligante se manteve variando pouco de sua posição inicial, depois ele trocou de posição no sítio catalítico e se estabeleceu em uma outra posição nos últimos 25 ns, na qual voltou a ficar estável como mostramos na figura 12. Como na estrutura cristalográfica que usamos como referência, o ligante se manteve na mesma posição durante toda a trajetória, chegamos à conclusão que essa posição inicial dada pelo atracamento molecular do ligante com o nosso modelo, não fosse a mais favorável. Com base nessa suposição optamos por avaliar apenas as energias de interação dos 20 ns finais da trajetória, como sendo essa a posição de interação do complexo proteína-ligante mais próxima da estabilização.

As variações das distâncias entre os átomos doadores e aceptores de elétrons na interação de hidrogênio das tirosinas 9 e 13, da estrutura cristalográfica PDB:1vf3 e do modelo *CgGSTA1.2*, respectivamente, com o ligante GDN, também foram monitoradas durante toda a trajetória. Desse modo é possível avaliar a participação dessas tirosinas na

estabilidade dos ligantes no sítio catalítico. O que observamos foi que mesmo para a estrutura cristalográfica de referência a distância entre os átomos foram maiores que 4 Å em boa parte do tempo, ou seja, estavam acima da distância máxima na qual se configura uma interação hidrogênio padrão (NELSON; COX, 2019). Quando observamos a decomposição de energia livre entre os resíduos da estrutura cristalográfica, percebemos que a Y9 de fato contribui pouco, quando comparado aos outros resíduos. Supomos que a interação de hidrogênio das tirosinas com o anel do CDNB não sejam características para a estabilização do ligante no sítio catalítico.

Por outro lado, observamos que o resíduo Y223 da estrutura cristalográfica interage por ligação de hidrogênio com o CDNB, e na decomposição de energia, ele aparece como um dos que mais contribuem para diminuir a energia livre de ligação do complexo. Entretanto, este resíduo não é conservado na extremidade C-terminal de nosso modelo proteico *CgGSTA1.2*, que possui uma arginina (224) na posição mais próxima. Desta forma, justifica-se do porquê o ligante não fica em nosso modelo em posição semelhante ao da estrutura cristalográfica, e também, justamente esta região ser a que mais se movimenta durante toda a trajetória de simulação por dinâmica molecular, como mostra os resultados de RMSF para o modelo *CgGSTA1.2* na figura 16.

Dentre todos os resíduos que aparecem contribuir na decomposição de energia livre para o complexo, tanto da estrutura cristalográfica quanto do nosso modelo com o ligante, a maioria está interagindo com a parte da GSH do conjugado. Sete desses pertencem a posições conservadas entre ambas estruturas, e na proteína *CgGSTA1.2* são representados pelos resíduos: Y13, R19, Q58, P60, T72, L11 e F115. A tirosina 13 e a arginina 19 são uns dos aminoácidos que mais contribuem nas interações, provavelmente por ligação de hidrogênio com a GSH. Esses dados corroboram com o que se tem na literatura sobre a participação de uma tirosina e arginina conservada na maioria das GSTs da classe alfa, que auxiliam na estabilização da GSH no sítio G da enzima (CAMERON *et al.*, 1995, BJÖRNESTEDT *et al.*, 1995). Já a tirosina 214, que aparece como a que mais contribui para a diminuição de energia livre do complexo *CgGSTA1.2*-GDN, não é conservada na estrutura cristalográfica de *G. gallus*, que usamos como referência, sendo assim, a interação com essa tirosina parece ser uma característica particular em *C. gigas*.

Para o modelo *CgGSTA1.2*, o único aminoácido que parece contribuir na decomposição de energia livre, em interações com o CDNB, é a valina 218. Mesmo que essa região do ligante não apareça muito estabilizada durante toda a trajetória de 150 ns da

simulação por DM, esse resíduo é um candidato importante do sítio H de nosso modelo proteico que contribui para estabilização do substrato eletrofílico, CDNB, através de interações hidrofóbicas.

Quando analisamos os resultados de atracamento molecular para o ligante HAG em nosso modelo de GST alfa de ostra, usamos como parâmetro de comparação sua interação na estrutura cristalográfica de GSTA4-4 de rato *Mus musculus* (XIAO *et al.*, 1999) Essa isoforma, já sabidamente apresenta uma alta atividade catalítica de conjugação entre a GSH e o 4-HNE (ZIMNIAK *et al.*, 1994). Quando tentamos reproduzir a posição de interação do ligante HAG encontrada para a estrutura cristalográfica em nosso modelo, não conseguimos ter sucesso, uma vez que o RMSD foi bastante alto, e diferente do que obtemos no *redocking*. Na posição mais próxima que conseguimos (RMSD > 3 Å), observamos poucas interações com resíduos conservados em ambas estruturas. O que podemos ressaltar é a interação com o aminoácido R19 no modelo *CgGSTA1.2*, que é correspondente ao R15 na estrutura cristalográfica, o qual já se sabe que tem uma participação importante e específica na orientação do ligante HAG no sítio catalítico da isoforma GSTA4-4 de *M. musculus* (XIAO *et al.*, 1999). A interação polar de uma treonina conservada em ambas estruturas com a porção da GSH do conjugado pôde ser evidenciada, uma vez que esse resíduo também aparece contribuindo na decomposição de energia livre para o complexo com o ligante GDN, reforçando a importância deste aminoácido no sítio catalítico de nosso modelo proteico. Portanto, mais estudos devem ser realizados com esse substrato para caracterizar sua interação no sítio catalítico da enzima *CgGSTA1.2*.

Os ensaio de atracamento molecular com o ligante GBX foi realizado usando a estrutura cristalográfica de uma outra isoforma de GST alfa de *M. musculus*, a GSTA2-2, que também, já apresenta estudos mostrando sua capacidade de catalisar a reação de conjugação entre a GSH e o (+)-*anti*-BPDE (XIA *et al.*, 1998). Apesar de não conseguirmos reproduzir a posição do ligante encontrada na estrutura cristalográfica com sucesso (RMSD > 3 Å), foi possível obter cinco interações hidrofóbicas no sítio H com o (+)-*anti*-BPDE e três interações de hidrogênio com a GSH, um padrão semelhante ao encontrado na estrutura cristalográfica, além disso, quatro desses aminoácidos aparecem conservados entre as estruturas. Porém, é importante salientar que os resíduos L207 e F221 da GSTA2-2 de *M. musculus* não são conservados na estrutura de GSTA1.2 de *C. gigas*, e eles já foram descritos como importantes para orientação do ligante GBX no sítio H da enzima (GU *et al.*, 2003).

Apesar dessa isoforma de GST alfa de *M. musculus* ser capaz de catalisar a reação de conjugação do (+)-*anti*-BPDE, sua atividade não é tão alta quando comparada a outras GSTs. Estudos demonstram que a isoforma GSTA1-1 de *M. musculus* é capaz de metabolizar esse substrato com mais eficiência, porém, mesmo se usássemos a estrutura cristalográfica GSTA1-1 de *M. musculus* como parâmetro de comparação, poucos resíduos do sítio H são conservados entre essa estrutura e o nosso modelo. A M207 e a I221 que são responsáveis pela orientação do ligante GBX nessa isoforma (GU *et al.*, 2003), também não são conservados na proteína CgGSTA1.2. A R216, que desempenha um papel igualmente importante (GU *et al.*, 2003) em nosso modelo é substituída pela K219 na mesma posição, porém não apareceu interagindo com o ligante no atracamento molecular. Desta forma, e considerando também que tanto em humanos quanto em roedores, as GSTs da classe alfa não são as principais responsáveis pela metabolização do (+)-*anti*-BPDE, mas sim as classes mu e pi (SINGH *et al.*, 2004), mais estudos devem ser feitos com a isoforma GSTA1.2 de *C. gigas* e esse substrato para elucidar essa questão.

Ainda assim, no teste de atracamento do nosso modelo com o ligante GBX foi possível notar a interação do resíduo Q58 com a parte da GSH do conjugado. Esse mesmo resíduo aparece como um dos contribuintes na decomposição de energia livre para o complexo CgGSTA1.2-GDN, reforçando sua importância e relevância no sítio G da enzima GSTA1.2 de ostra *C. gigas*.

6 CONCLUSÃO

A proposta de caracterizar a isoforma enzimática de GST alfa1.2 de ostra *C. gigas* através de sua interação com possíveis substratos foi atingida nesse trabalho ao empregar o uso de metodologias computacionais. Através do atracamento molecular, vimos que dentre os três ligantes testados, o GDN e o GBX foram os que apresentaram mais interações no sítio catalítico da enzima, apontando evidências para a capacidade da enzima de metabolizar os substratos 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e (+)-*anti*-BPDE, respectivamente. O ligante HAG além de ter apresentado menor número de interações com resíduos do sítio catalítico, também obteve menos sucesso ao reproduzir a posição encontrada na estrutura cristalográfica de referência, que sabidamente metaboliza o substrato 4-hidroxinonal, indicando que a isoforma de GST alfa de ostra metaboliza com baixa eficácia esse substrato.

Corroborando com os resultados obtidos por Deconto (2022), que apontaram a capacidade funcional da enzima *CgGSTA1.2* de metabolizar o substrato CDNB, e também corroborando com o que se tem na literatura sobre as GSTs da classe alfa de outros animais, nossos resultados da simulação por dinâmica molecular indicaram a capacidade do modelo enzimático estudado de interagir com o ligante GDN. Essas interações ocorrem através de resíduos conservados e o padrão de interação é semelhante ao da estrutura cristalográfica de vertebrado usada como referência. Também foi possível concluir que o resíduo de tirosina 13 não parece ser tão importante para a estabilização do conjugado no sítio catalítico através de interações com o anel aromático do CDNB. Esse resíduo provavelmente estabiliza o ligante através de interações com a parte da GSH do conjugado.

Nossos dados de dinâmica molecular sugerem que se faz necessário prolongar por mais tempo as simulações para analisar com mais precisão o comportamento da porção eletrofílica do conjugado no sítio H da enzima. Além disso, como perspectivas, pretendemos realizar experimentos de dinâmica molecular também para os outros dois substratos testados na etapa de atracamento molecular, especialmente para o (+)-*anti*-BPDE que se mostrou um substrato promissor para isoforma enzimática *CgGSTA1.2*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, Mark James *et al.* GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **Software**, v. 1-2, p. 19-25, set. 2015.
- ALIAS, Zazali. The Role of Glutathione Transferases in the Development of Insecticide Resistance. **Insecticides Resistance**, [S.L.], n. 16, p. 315-333, 2 mar. 2016.
- 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.
- BJÖRNSTEDT, Robert *et al.* Functional significance of arginine 15 in the active site of human class alpha glutathione transferase A1-1. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 247, n. 4, p. 765-773, abr. 1995.
- BRUNS, Christopher M. *et al.* Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 288, n. 3, p. 427-439, maio 1999.
- CAMERON, Alexander D. *et al.* Structural analysis of human alpha-class glutathione transferase A1-1 in the apo-form and in complexes with ethacrynic acid and its glutathione conjugate. **Structure**, [S.L.], v. 3, n. 7, p. 717-727, jul. 1995.
- COLE, Jason C. *et al.* Comparing protein-ligand docking programs is difficult. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 325-332, 3 jun. 2005.
- DECONTO, Vanessa Schadeck. **Prevalência das isoformas de Glutathione S-transferase em diferentes tecidos de ostras Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)**. 2019. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.
- DECONTO, Vanessa Schadeck. **Caracterização da enzima Glutathione S-transferase alfa1.2 recombinante de ostra Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)**. 2022. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.
- DIRR, Heini; REINEMER, Peter; HUBER, Robert. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. **Ejb Reviews** 1994, [S.L.], p. 57-73, 1994.
- DIRR, Heini W.; WALLACE, Louise A.. Role of the C-Terminal Helix 9 in the Stability and Ligandin Function of Class α Glutathione Transferase A1-1. **Biochemistry**, [S.L.], v. 38, n. 47, p. 15631-15640, 1 nov. 1999.
- DIXON, David P. *et al.* Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 1-10, fev. 2002.

DOURADO, Daniel; FERNANDES, Pedro; RAMOS, Maria. Mammalian Cytosolic Glutathione Transferases. **Current Protein & Peptide Science**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 325-337, 1 ago. 2008.

EATON, David L; BAMMLER, Theo K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 156-164, 1 jun. 1999.

GALLOWAY, T.S. et al. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 2219-2226, 2002.

GROSDIDIER, Aurélien; ZOETE, Vincent; MICHIELIN, Olivier. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 39, n. , p. 270-277, 29 maio 2011.

GU, Yijun *et al.* Residues 207, 216, and 221 and the Catalytic Activity of mGSTA1-1 and mGSTA2-2 toward Benzo[a]pyrene-(7R,8S)-diol-(9S,10R)-epoxide,. **Biochemistry**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 917-921, 7 jan. 2003.

GUEDES, Isabella A.; MAGALHÃES, Camila S. de; DARDENNE, Laurent E.. Atracamento Molecular. In: VERLI, Hugo. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - Sbbq, 2014. p. 189-208.

GUSTAFSSON, Ann *et al.* The C-Terminal Region of Human Glutathione Transferase A1-1 Affects the Rate of Glutathione Binding and the Ionization of the Active-Site Tyr9. **Biochemistry**, [S.L.], v. 38, n. 49, p. 16268-16275, 17 nov. 1999.

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

HAYES, John D.; STRANGE, Richard C.. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. **Pharmacology**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 154-166, 2000.

HODGSON, Ernest. Introduction to Biotransformation (Metabolism). **Hayes' Handbook Of Pesticide Toxicology**, [S.L.], p. 865-875, 2010.

JOHANSSON, Ann-Sofie; MANNERVIK, Bengt. Human Glutathione Transferase A3-3, a Highly Efficient Catalyst of Double-bond Isomerization in the Biosynthetic Pathway of Steroid Hormones. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 276, n. 35, p. 33061-33065, ago. 2001.

KONISHI, Takafumi *et al.* A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 388, n. 1, p. 299-307, 10 maio 2005.

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

LI, Lanlan *et al.* 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.

LIN, S.C. *et al.* CGSTA1-1 in complex with glutathione conjugate of CDNB. **Worldwide Protein Data Bank**, 2005.

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

MANNERVIK, Bengt. Glutathione and evolution of enzymes for detoxication of products of oxygen metabolism. **Chemica Scripta**. [S.L.], p. 281-284, 1986.

MANNERVIK, Bengt; DANIELSON, U. Helena; KETTERER, Brian. Glutathione Transferases—Structure and Catalytic Activity. **Critical Reviews In Biochemistry**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 283-337, jan. 1988.

MONTINE, Thomas J. *et al.* Crosslinking of Apolipoprotein E by Products of Lipid Peroxidation. **Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology**, [S.L.], v. 55, n. 2, p. 202-210, fev. 1996.

NELSON, David L; COX, Michael M. (ed.). **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NUNES, Fabrício F. **Avaliação de respostas bioquímicas, moleculares e da expressão proteômica em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário**. 2013. 183 f. Tese (Doutorado) - Curso de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

OAKLEY, Aaron J. *et al.* The structures of human glutathione transferase P1-1 in complex with glutathione and various inhibitors at high resolution. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 274, n. 1, p. 84-100, nov. 1997.

OOST, Ron van Der; BEYER, Jonny; VERMEULEN, Nico P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 57-149, fev. 2003.

PARK, Jun Chul. *et al.* The glutathione S-transferase genes in marine rotifers and copepods: identification of gsts and applications for ecotoxicological studies. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 156, p. 111080, jul. 2020.

PEAKALL, D. B.; WALKER, C. H.. The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates. **Ecotoxicology**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 173-179, set. 1994.

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

RAGHUNATHAN, Srinivasan *et al.* Crystal Structure of Human Class mu Glutathione Transferase GSTM2-2. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 238, n. 5, p. 815-832, maio 1994.

ROBERTSON, I.G.C. *et al.* Differences in selectivity and catalytic efficiency of three human transferases in the conjugation of glutathione with 7b, 8a-hydroxy-9-a, 10a-oxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. **Cancer Res**, [S.L.], v. 46, n. 5, p. 2220–2224. 1986a.

ROBERTSON, I.G.C. *et al.* Glutathione transferases in rat lung: the presence of transferase 7-7, highly efficient in the conjugation of glutathione with the carcinogenic (+)-7b, 8a-dihydroxy-9a, 10a-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. **Carcinogenesis**, [S.L.], v. 7, p. 295–299. 1986b.

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

SAYED, Yasien; WALLACE, Louise A.; DIRR, Heini W.. The hydrophobic lock-and-key intersubunit motif of glutathione transferase A1-1: implications for catalysis, ligandin function and stability. **Febs Letters**, [S.L.], v. 465, n. 2-3, p. 169-172, 14 jan. 2000.

SCHRÖDINGER, L. L. C. The PyMOL molecular graphics system, Version 2.3.3. 2019.

SHEEHAN, David *et al.* Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 360, n. 1, p. 1-16, 8 nov. 2001.

SILVA, Christielly R. **Expressão heteróloga de citocromo P450 356A1 de *Crassostrea gigas* e utilização para biomonitoramento ambiental**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

SILVA, Sérgio Ruschi Bergamachi. **Avaliação da termoestabilidade, atividade e resistência a ambientes ácidos de uma enzima de interesse biotecnológico via dinâmica molecular**. 2018. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

SINGH, Shivendra V. *et al.* Structural Basis for Catalytic Differences between α Class Human Glutathione Transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 for Glutathione Conjugation of Environmental Carcinogen Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide. **Biochemistry**, [S.L.], v. 43, n. 30, p. 9708-9715, 10 jul. 2004.

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

TLILI, Sofiene; MOUNEYRAC, Catherine. New challenges of marine ecotoxicology in a global change context. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 166, p. 112242, maio 2021.

VALDÉS-TRESANCO, Mario S. *et al.* 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.

VAN BLADEREN, Peter J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 129, n. 1-2, p. 61-76, dez. 2000.

VANOMMESLAEGHE, K *et al.* 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**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 671-690, jul. 2009. Wiley.

VERLI, Hugo. Dinâmica Molecular. In: VERLI, Hugo. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - Sbbq, 2014. p. 173-187.

VUILLEUMIER, Stéphane. Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for?. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 179, n. 5, p. 1431-1441, mar. 1997.

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

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.

XIA, Hong *et al.* Cloning, Expression, and Biochemical Characterization of a Functionally Novel Alpha Class GlutathioneS-Transferase with Exceptional Activity in the Glutathione Conjugation of (+)-Anti-7,8-dihydroxy-9,10-oxy-7,8,9,10tetrahydrobenzo(a)pyrene. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 353, n. 2, p. 337-348, maio 1998.

XIAO, Bing *et al.* Crystal Structure of a Murine Glutathione S-Transferase in Complex with a Glutathione Conjugate of 4-Hydroxynon-2-enal in One Subunit and Glutathione in the Other: ∴ evidence of signaling across the dimer interface. **Biochemistry**, [S.L.], v. 38, n. 37, p. 11887-11894, 20 ago. 1999.

YORITAKA, Asako *et al.* Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 93, n. 7, p. 2696-2701, 2 abr. 1996.

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

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

ZIMNIAK, Piotr *et al.* Estimation of genomic complexity, heterologous expression, and enzymatic characterization of mouse glutathione S-transferase mGSTA4-4 (GST 5.7). **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 269, n. 2, p. 992-1000, jan. 1994.

ZIMNIAK, Piotr; SINGH, Sharda P.. Families of Glutathione Transferases. In: AWASTHI, Yogesh C.. **Toxicology of Glutathione Transferases**. Galveston: Taylor & Francis, 2006. p. 11-26.

ZIMNIAK, Piotr. Substrates and Reaction Mechanisms of Glutathione Transferases. In: AWASTHI, Yogesh C.. **Toxicology of Glutathione Transferases**. Galveston: Taylor & Francis, 2006. p. 71-102.