



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DANIELA BARRETTO BARBOSA TRIVELLA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GLUTATIONA *S*-TRANSFERASE
(E.C. 2.5.1.18) DE BRÂNQUIAS DE OSTRAS *Crassostrea*
rhizophorae (GUILDING, 1828)

Florianópolis, fevereiro de 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DANIELA BARRETTO BARBOSA TRIVELLA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE
(E.C. 2.5.1.18) DE BRÂNQUIAS DE OSTRAS *Crassostrea*
rhizophorae (GUILDING, 1828)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Biotecnologia, nível mestrado,
como requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre.

Orientadores: Prof. Dr. Afonso C. D. Bainy
Profa. Dra. Maria Risoleta F. Marques

Florianópolis, fevereiro de 2006.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado. Aos meus orientadores Prof. Dr. Afonso C.D. Bainy e Profa.Dra. Maria Risoleta F. Marques pelos momentos *in* e *out* laboratório!!! Aos professores do curso de Pós Graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos e acompanhamento ao longo desses dois anos. A Joyce e a Lígia da secretaria do curso pelo apoio em todos os momentos e rolos do processo !

Aos membros ordinários e agregados do LABCAI que compartilharam bons, maus, estressantes, cômicos, embriagados, soníferos, cafeinados, e outros momentos que não devo comentar ... hehehehehe !!! Bel, Ju, Ricardo, Lila, Karim, Fábio, Igor, Simone, Gui, Thiago, Mariana, Japa, Karina B.B., Janice, Eduardo, Francisco, Giuliana, Daniel, Gabriel, Ana Paula, Paulito e outros que passam por lá de vez em quando !!!

Um agradecimento especial para minhas co-co orientadoras Taise Bresolin e Isabel C. Muller, aos meus comparsas de sala escura Jacó e Lila !!! Especial também a Jú – suporte técnico para as dúvidas intermináveis de minha problemática memória e ao Gui olheiro da coluna !!! Um agradecimento particular para a Karim Maria, companheira de projetos CNPq ... uma hora tinha que dar certo, né?!

Aos meus companheiros de trabalhos paralelos e artigos Alcir e Jeferson !

Ao Prof Dr. José Camillo Novello e ao doutorando Daniel Martins pela GRANDE força nas análises de eletroforese bidimensional.

Agradeço também aos meus amigos do complexo campeche, agregados e fofas, hehehe !!! Aos monossílabos: Di, Pri, Clau, Val, Syl, Rô (rrrrrrô !!!), Gi, Pri, Tra e Fê e aos di, tri e polissílabos: Nora, Elisa, Gigi, Aninha, Léo, Lucas ... Vocês com certeza tiveram grande e significativa participação no trabalho e ai de vocês se errarem o nome da *Crassostrea rhizophorae* !!!!

E agora o agradecimento mais importante ... a minha mãe, meus irmãos Paula e Rê, a Lili e ao recém chegado Iberê !!!! Valeu gente !!!

Valeu mesmo !!! Agora eu juro que quando tudo isso acabar passo 1 semana longe do pc, ok?!

Não preciso nem dizer que vai rolar uma festinha, né?! Hehehehehehe !!!

ÍNDICE

I - ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
II - ÍNDICE DE TABELAS	8
III - ÍNDICE DE EQUAÇÕES	9
IV - LISTA DE ABREVIACÕES	10
V - RESUMO	11
VI- ABSTRACT	12
1 – INTRODUÇÃO	13
1.1 – Contaminação aquática.....	13
1.2 – Biomonitoramento de Ambientes Marinho/ Estuarinos	15
1.3 - Moluscos bivalves e biomonitoramento.....	18
1.4 – Biomarcadores de contaminação	20
1.5 – Glutathione S-transferases	23
1.5.1 – Funções das GSTs	23
1.5.2 – Localização.....	24
1.5.3 – Isoformas	25
1.5.4 – Substratos das GSTs	27
1.5.5 - Sítios Ativos	29
1.5.6 - Genes.....	30
1.5.7 - Distribuição nos tecidos	31
1.5.9 - Interesse no estudo de GSTs	32
2 - OBJETIVO	34
2.1 - Objetivos específicos	34
3 - JUSTIFICATIVA	35
4 - MÉTODOS.....	37
4.1 - Material Biológico	37
4.2 – Preparação das amostras	37
4.3 - Purificação da GST de brânquias de ostras <i>C. rhizophorae</i>	38

4.3.1 - Coluna G25	38
4.3.2 – Coluna GSH – agarose	39
4.4 - Diálise	40
4.5 - Determinação da concentração de proteínas totais	40
4.5.1 - Absorbância em luz U.V.	40
4.5.2 - Método de Lowry	43
4.6 - Precipitação de proteínas.....	45
4.7 - Análises enzimáticas.....	46
4.7.1 - Substrato CDNB.....	46
4.7.2 - Substrato Ácido etacrínico (ETA).....	48
4.7.3 - Determinação de parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}).....	49
4.8 - Eletroforese.....	50
4.8.1 - Eletroforese em mini gel PAGE/SDS	50
4.8.2 – Eletroforese Bidimensional (2D).....	52
4.8.3 - Coloração com Nitrato de Prata	54
4.9 - Sequenciamento da porção N- terminal	55
5 – RESULTADOS.....	57
5.1 – Purificação	57
5.1.1 - Coluna G-25.	57
5.1.2 – Coluna GSH-agarose	59
5.2 - Diálise	60
5.3 - Dosagem de proteínas	61
5.3 - Análises enzimáticas.....	64
5.3.1 - Atividade da GST-CDNB	65
5.3.2 - Atividade da GST-ETA.....	66
5.3.3 – Parâmetros cinéticos da GST purificada.....	67
5.4 - Eletroforese.....	70
5.4.1 - Eletroforese em mini gel	70
5.4.2 - Eletroforese bidimensional.....	71
5.5 - Sequenciamento da região N-terminal	73
7 – DISCUSSÃO	75
8 – REFERÊNCIAS.....	82

I - Índice de Figuras

FIGURA 1 - EQUAÇÃO GERAL DA REAÇÃO CATALISADA PELAS GSTs. NESTE EXEMPLO O SUBSTRATO UTILIZADO É CDNB (1 CLORO 2,4 - DINITROBENZENO) (KEEN; JACKOBY, 1978).....	23
FIGURA 2 - ESTRUTURA DE GSTs DE DIFERENTES CLASSES: CLASSE ALPHA HUMANA, PI HUMANA, MU DE RATO E TETHA HUMANA. DESTAQUE PARA CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS ESPECÍFICAS DE CADA CLASSES, COMO A α -HÉLICE 9 NA CLASSES ALPHA E O MU LOOP NA CLASSE MU (SHEEHAN ET AL., 2001)	26
FIGURA 3 – ESTRUTURA DO TRIPEPTÍDEO GLUTATIONA.....	28
FIGURA 4 – PERFIL DE ELUIÇÃO DE PROTEÍNAS DURANTE CROMATOGRAFIA EM COLUNA G25 DO EXTRATO BRUTO DE BRÂNCUIAS DE OSTRAS <i>C. RHIZOPHORAE</i> , MONITORANDO A ABSORBÂNCIA A 280NM. O VALOR LIMITE PARA DETECÇÃO DA ABSORBÂNCIA NO ESPECTROFOTÔMETRO UTILIZADO É 3,0.....	58
FIGURA 5 – PERFIL DE PROTEÍNAS NAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE AFINIDADE GSH-AGAROSE MONITORADO ATRAVÉS DA LEITURA DA ABSORBÂNCIA A 280 NM (EIXO Y DA ESQUERDA) E PELA QUANTIFICAÇÃO UTILIZANDO-SE O MÉTODO DE LOWRY (EIXO Y DA DIREITA).....	60
FIGURA 6 - CURVA PADRÃO DE PROTEÍNAS, UTILIZANDO ALBUMINA SÉRICA COMO PADRÃO EM DIFERENTES SOLUÇÕES.....	62
FIGURA 7 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESPECÍFICA DA GST-CDNB NAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA GSH-AGAROSE. OS DADOS ESTÃO PLOTADOS EM U/ ML E EM U/ MG DE PROTEÍNA (U = μ MOL/ MIN).	65
FIGURA 8 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ESPECÍFICA DA GST-ETA NAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA GSH-AGAROSE. OS DADOS ESTÃO PLOTADOS COMO U/ ML E U/ MG DE PROTEÍNA (U = μ MOL/ MIN).	66
FIGURA 9 - PERFIL DA ATIVIDADE DE GSTs, ISOLADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE, UTILIZANDO-SE GSH 1 mM E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CO-SUBSTRATO CDNB (0,5; 1,0; 2,0 E 4,0 mM) (N=4).....	68
FIGURA 10 - PERFIL DA ATIVIDADE DE GSTs, ISOLADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE, UTILIZANDO-SE O CO-SUBSTRATO CDNB EM 1MM E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO SUBSTRATO GSH (1,0; 2,0 E 4,0 mM)(N=4)	69
FIGURA 11 - PAGE/SDS EM MINI GEL 15 % DAS ALÍQUOTAS OBTIDAS NO PICO DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE AFINIDADE. À ESQUERDA PODE SER VISUALIZADO O MARCADOR DE PESO MOLECULAR KALEIDOSCOPE (BIO-RAD) COM AS RESPECTIVAS MASSAS MOLECULARES. AS LINHAS 1,2,3 E 4 REPRESENTAM AS FRAÇÕES ELUÍDAS, E	

A LINHA 5 O MARCADOR DE MASSA PURIFICADO BJJ0 DE 25 kDa. COLORAÇÃO POR PRATA.	70
FIGURA 12 - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DAS ALÍQUOTAS OBTIDAS NO PICO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE. À DIREITA ENCONTRAM-SE OS MARCADORES DE MASSA MOLECULAR, COM OS RESPECTIVOS VALORES. FOI MOSTRADO APENAS A FAIXA DE pI ONDE APARECERAM OS SPOTS (4,5 - 8,0). COLORAÇÃO POR PRATA.	71

II - Índice de Tabelas

TABELA 1 - SUBSTRATOS PREFERENCIAIS DE DIFERENTES ISOFORMAS DE GST, SEGUNDO BOYLAND; CHASSEAUD, 1969; BOYLAND; SPEYER, 1970; CHASSEAUD, 1973; MOTOYAMA; DAUTERMAN, 1979.	27
TABELA 2 – ABSORBÂNCIA QUANTIFICADA A 280 NM E ATIVIDADE DE GST UTILIZANDO-SE O SUBSTRATO CDNB (U/ MIN) DAS ALÍQUOTAS ELUÍDAS DA COLUNA G-25 COM TAMPÃO PBS.	58
TABELA 3 - COMPARAÇÃO DO CÁLCULO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS, NAS DIFERENTES METODOLOGIAS UTILIZADAS.	63
TABELA 4 - DADOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE AO SUBSTRATO CDNB E ETA E CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS (LOWRY) DAS FRAÇÕES QUE REPRESENTAVAM OS PICOS DE ELUIÇÃO COM PBS E TRIS-GSH. OS PICOS DE ATIVIDADE ESTÃO EM NEGRITO, ND = NÃO DETECTADO (U= $\mu\text{MOL}/\text{MIN}$).....	64
TABELA 5 - CÁLCULO DA MASSA MOLECULAR APARENTE DOS SPOTS DETECTADOS POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.	72
TABELA 6 - SEQUENCIAMENTO DA PORÇÃO N-TERMINAL DOS SPOTS 1, 2, 3 E 4, EM SEQÜENCIADOR SHIMADZU (PPSQ-23A).....	73
TABELA 7 - VALORES DE K_M PARA CDNB E GSH EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MOLUSCOS BIVALVES (ADAPTADO DE YANG, 2004).	78

III - índice de Equações

EQUAÇÃO 1 - CORREÇÃO, POR MINIMIZAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLÉICOS, DO CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS MEDIDA A PARTIR DA ABSORBÂNCIA A 280NM E 260 NM, BASEADO NO MÉTODO DE SCHLEIF & WENSINK (1981).....	42
EQUAÇÃO 2 - CORREÇÃO DO CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS MEDIDA A PARTIR DA ABSORBÂNCIA A 280NM E 205 NM, BASEADO NO MÉTODO DE SCOPES (1974).....	42
EQUAÇÃO 3 - CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, PELO MÉTODO DE LOWRY, MODIFICADO POR PETERSON (1983), UTILIZANDO-SE UMA CURVA PADRÃO DE ALBUMINA (PETERSON, 1983).....	44
EQUAÇÃO 4 - CÁLCULO ATIVIDADE CDNB.....	47
EQUAÇÃO 5 - CÁLCULO ATIVIDADE ETA.....	48
EQUAÇÃO 6: CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS K_M E V_{MAX} - ONE SITE BINDING (HYPERBOLA).....	49

IV - Lista de Abreviações

BEEP	Biological Effects of Environmental Pollution
BSA	albumina soro bovina
CAT	catalase
CDNB	1-cloro 2,4-dinitrobenzeno
CYP450	citocromo P450
DNA	ácido desoxi ribonucléico
DOC-TCA	deoxicolato de sódio - ácido tricloroacético
DTT	ditiotreitól
EDTA	ethilenodiaminotetraacetic acid
EROs	espécies reativas de oxigênio
ETA	ácido etacrínico
FATMA	Fundação do Meio Ambiente/ SC
<i>g</i>	unidade de centrifugação
GI-GERCO	Grupo de Integração do Gerenciamento Costeiro
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione na forma reduzida
GST	glutathione S-transferase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HPLC	high performance liquid chromatography
HSPs	heat shock proteins
ICES	International Council for Exploration of the Sea
KDa	unidade de massa molecular (quilo Daltons)
K _m	constante de Michaelis-Menten
LCM	Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos - CCA, UFSC
LPO	lipo-peroxidação
MED-POL	Programa de Biomonitoramento do Mediterrâneo Nordeste
MOAT	transportador multi-específico de ânions orgânicos
nm	nanômetros
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
ORF	open read frame (janela aberta de leitura)
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	unidade de ácidos nucleicos (pares de base)
PBS	tampão fosfato salino
PDB	protein data bank
Pgp	glicoproteína P
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF	polivinilidene fluoride
SDS	dodecil sulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
U.V.	ultra-violeta
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UNICAMP	Universidade de Campinas
V _{max}	velocidade máxima

V - Resumo

A ostra *Crassostrea rhizophorae* vem sendo amplamente utilizada como um organismo sentinela em programas de biomonitoramento marinho. Biomarcadores de contaminação são ferramentas importantes para a avaliação dos efeitos provocados por contaminantes em organismos expostos. No entanto, são necessários estudos que visem uma melhor compreensão, caracterização e padronização do uso destas respostas bioquímico-moleculares para que as mesmas possam ser utilizadas em estudos Ecotoxicológicos. A família das GST é comumente utilizada como biomarcador de exposição a xenobióticos. Estas enzimas desempenham importante papel nos processos de detoxificação celular, catalisando algumas das principais reações de conjugação da Fase II de biotransformação. O objetivo do presente estudo foi purificar e caracterizar GSTs de brânquias de ostras do mangue *C. rhizophorae*. Extratos de brânquias foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna GSH-agarose. A atividade da GST das frações eluídas foi testada utilizando-se os substratos 1-cloro, 2,4-dinitrobenzeno (GST-CDNB) e ácido etacrínico (GST-ETA). As frações que apresentaram atividade foram analisadas através de eletroforese bidimensional e ensaios cinéticos utilizando os substratos CDNB e GSH. A atividade da GST no pico de eluição da coluna de afinidade foi 14,1 e 7,5 U/ mg de proteína para os substratos CDNB e ETA, respectivamente. A massa molecular aparente foi de 26,09 kDa, sendo que foram observados seis *spots* de pI diferentes (pI 7,6-5,4), sugerindo a presença de diferentes sub-unidades. Os valores de K_m determinados foram $K_m_{CDNB} = 1,37$ mM e $K_m_{GSH} = 0,77$ mM. Os resultados obtidos foram similares aos observados previamente em estudos com GSTs de diferentes espécies de organismos aquáticos. A elevada atividade da GST-ETA sugere a presença de isoformas da classe *Pi*, e que esta é, possivelmente, a mais representativa isoforma de GST em brânquias de ostras *C. rhizophorae*. No entanto, estudos subseqüentes deverão ser realizados visando identificar outras isoformas de GST presentes nesta espécie.

Palavras-chave: Glutathione S-transferase, purificação, *Crassostrea rhizophorae*, electrophorese 2D, parâmetros cinéticos, ostras, biomarcadores.

VI- Abstract

Mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* has been extensively used as a sentinel organism in marine monitoring programs. Biomarkers of contamination are important tools to understand the effects elicited by contaminants in exposed organisms. However, studies aiming the understanding, characterization and standardization of these biochemical-molecular responses in ecotoxicological studies are still required. The GST family is commonly used as biomarkers of exposure to xenobiotics. These enzymes play an important role in cell detoxification, catalyzing one of the major Phase II biotransformation reactions. The aim of this study was to purify and to characterize the GSTs from gills of *C. rhizophorae*. Gill extracts were submitted to affinity chromatography using GSH-agarose column. The GST activity was analyzed in the eluted fractions using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (GST-CDNB) and ethachrinic acid (GST-ETA). The fractions containing the peaks of GST activity were submitted to 2D electrophoresis and kinetics analysis, using CDNB and GSH. The activity detected in the elution peaks was 14,1 and 7,5 U/ mg protein for CDNB and ETA, respectively. The apparent molecular mass was 26,09 kDa and six spots with pI values ranged from 7,6 to 5,4 were observed, suggesting the presence of different GST subunits. The K_m values were $K_m_{CDNB} = 1,37$ mM and $K_m_{GSH} = 0,77$ mM. These findings are in agreement with those observed for GSTs in similar studies carried out in different species of aquatic organisms. The elevated GST-ETA suggests the presence of GST *Pi* class isoform and that is, possibly, the most abundant GST isoform in the gills of *C. rhizophorae*. Moreover, subsequent studies need to be carried out to identify other GST isoforms in this specie.

Key words: Glutathione S-transferase, purification, *Crassostrea rhizophorae*, 2D electrophoresis, kinetic parameters, oyster, biomarkers.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Contaminação aquática

Ambientes marinhos sofrem constantes despejos de poluentes, o que pode resultar em efeitos ecológicos bastante relevantes. Os ecossistemas estuarinos, em particular, e principalmente regiões de manguezal, são extremamente sensíveis à contaminação.

A contaminação aquática pode ser provocada por substâncias tóxicas, que incluem tanto substâncias químicas de ocorrência natural, como compostos sintéticos (Pew Ocean Commission, 2001). A maioria dos poluentes, no entanto, são xenobióticos, ou seja, compostos exógenos ao metabolismo dos organismos, e outros componentes endógenos que, em altas concentrações, ou administrados por vias não naturais mostram, também, efeitos tóxicos sobre os sistemas biológicos (ex.: glutamato e hormônios) (Hodgson; Levy, 1994).

Os poluentes de origem antropogênica contribuem mais significativamente para a contaminação dos ambientes marinhos. Segundo Sindermann (1996), o impacto humano nestes ambientes, principalmente sobre a costa e estuários, está diretamente relacionado à densidade da população humana adjacente e à concentração de parques industriais nas regiões costeiras. Dentre os locais mais impactados pelas atividades humanas estão a região metropolitana de Nova York, do Sul da Califórnia, o Mar Báltico, o Porto de Tóquio e o mar Mediterrâneo. As principais fontes de contaminação dos ambientes marinhos são o lançamento de

efluentes domésticos e industriais, sem o tratamento adequado; de resíduos de petróleo, provenientes de atividades que utilizam óleo combustível, vazamento e lavagem de postos de abastecimento e acidentes com derramamentos de petróleo; além de contaminantes que podem ser transportados pelo ar e então serem inseridos nestes ecossistemas.

No Brasil, os problemas de poluição marinha estão se agravando, conforme constatado pelo Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União (Ministério do Meio Ambiente, 1996). Este levantamento constatou um padrão de assentamento humano concentrado, distribuído com certa regularidade ao longo do litoral, aliado à grande expansão industrial em determinadas regiões. Estes aglomerados humanos, produzem grandes quantidades de efluentes domésticos e industriais, os quais freqüentemente são lançados no ambiente sem tratamento prévio, comprometendo a qualidade dos ecossistemas costeiros (Ministério do Meio Ambiente, 2004).

Segundo o Boletim de Balneabilidade da Fundação do Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina (FATMA, 2005), de 29 de Dezembro de 2005, 25 dos 185 pontos de coleta analisados no litoral catarinense apresentaram contaminação por esgoto doméstico. Este estudo consistiu no monitoramento da presença de coliformes da espécie *Escherichia coli*, em pontos de coleta distribuídos por todo o litoral catarinense. Destes 25 pontos contaminados, considerados “impróprios para banho”, 15 localizam-se na cidade de Florianópolis.

1.2 – Biomonitoramento de Ambientes Marinho/ Estuarinos

O objetivo do monitoramento é coletar dados suficientes para avaliar a qualidade do ambiente. O monitoramento biológico (ou biomonitoramento) desempenha um papel central na ecotoxicologia aquática, utilizando sistematicamente organismos vivos para investigar mudanças no ambiente e na qualidade da água. As análises podem ser realizadas por observação de indivíduos, espécies populações e/ou comunidades, a fim de compreender mudanças que possam ocorrer como resultado de exposição química por longos (exposição crônica) ou curtos (exposição aguda) períodos de tempo. O Biomonitoramento é importante, pois as respostas biológicas (efeitos) podem ser causadas por concentrações abaixo dos limites de detecção de químicos ou serem detectadas mesmo após o encerramento da exposição ao químico (Rand, 1995).

A contaminação aquática pode ser avaliada por determinação direta da concentração de contaminantes (quantificação química) ou por indicadores biológicos de contaminação (bioindicadores e biomarcadores de contaminação aquática). Segundo Bainy (1990), o uso de parâmetros bioquímicos, como biomarcadores de poluição, fornece algumas vantagens em relação à determinação direta da concentração de poluentes no meio. As vantagens de indicadores biológicos são o baixo custo, metodologia de análise relativamente simples e, principalmente, a possibilidade de quantificar os danos bioquímicos relacionados com alterações estruturais e fisiológicas, nos organismos expostos, causados pelos contaminantes.

Além disso, a determinação da concentração de poluentes no meio, bem como a bioacumulação destes compostos tóxicos nos tecidos animais não reflete, necessariamente, o estado de saúde dos mesmos (Pellerin-Massicotte, 1994). A identificação dos efeitos (análises biológicas e ecotoxicológicas) e da causa (análises químicas) são importantes para a obtenção de um diagnóstico mais preciso da contaminação aquática (Blaise et al, 1988)

Procedimentos biológicos de diversos tipos, incluindo testes de toxicidade, estão sendo elaborados por entidades governamentais em diversos países em todos os continentes. Os órgãos ambientais incluem os biotestes como parâmetros de controle nas licenças de atividades potencialmente causadoras de poluição e usam os ensaios ecotoxicológicos para monitorar a qualidade das águas e identificar as fontes poluidoras. Programas que utilizam biomarcadores de contaminação aquática para tal finalidade no Brasil ainda são escassos devido a falta de conhecimento básico em espécies nativas.

Os biomarcadores de contaminação são definidos como alterações biológicas em nível molecular, celular e fisiológico que expressam efeitos provocados por poluentes. Entre os biomarcadores, os bioquímicos ou moleculares, detectam as primeiras alterações biológicas frente à presença de um xenobiótico (Walker et al., 1996).

Por estes motivos, o Conselho Internacional para a Exploração do Mar (ICES) tem recomendado que os programas de biomonitoramento marinho utilizem biomarcadores como metodologia complementar para expressar os efeitos tóxicos causados pelos poluentes nos organismos (Burgeot et al., 1996).

Programas de biomonitoramento marinho são realizados em diversas regiões do mundo, com o intuito de alertar e prevenir impactos irreversíveis nestes ecossistemas, em uma estratégia de precaução. A comunidade europeia encontra-se mais desenvolvida neste sentido, sendo que os programas de biomonitoramento marinho realizados nesta região são utilizados, geralmente, como referência para outros programas em distintas regiões do globo terrestre. O programa BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution) encontra-se em desenvolvimento, na Europa, desde 2001, e apresenta perspectivas para padronização internacional de técnicas utilizadas com finalidade de biomonitoramento marinho. O BEEP inclui a análise de parâmetros enzimáticos e genéticos, utilizando espécies ecologicamente relevantes (Plymouth Marine Laboratory, 2006).

No Brasil, o Grupo de Integração do Gerenciamento Costeiro (GI-GERCO), criado no âmbito da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM), propõe o monitoramento sistemático da qualidade ambiental, a disponibilização de dados e informações qualificadas para o planejamento e a gestão, bem como a integração dos esforços de pesquisa e investigação voltados ao conhecimento dos fatores que compõem a dinâmica da Zona Costeira (II Workshop Regional Sul sobre o Mar, 1998).

A escolha do organismo a ser utilizado em um programa de biomonitoramento é um passo de primordial importância para o sucesso do estudo.

1.3 - Moluscos bivalves e biomonitoramento

Os organismos aquáticos mais utilizados em biomonitoramento são os peixes, as aves e os macroinvertebrados, particularmente os moluscos bivalves.

Os moluscos bivalves são organismos adequados para estudos de biomonitoramento aquático, por serem sésseis, cosmopolitas, filtradores, abundantes, resistentes às variações ambientais (temperatura, salinidade, etc.) e acumularem grande quantidade de contaminantes (Phillips, 1986; Viarengo & Canesi, 1991; NOAA, 1995; Rand, 1995). Além disto, são capazes de sobreviver, expressando alterações metabólicas, após exposição a contaminantes (Walker et al., 1996).

A ostra *Crassostrea rhizophorae* tem sido utilizada como organismo sentinela em estudos de contaminação aquática no Brasil (Nascimento, 1998; 2000; Lopes, 2002; Zanette et al., 2003; Rebelo et al., 2003; Trivella, 2004, Amaral et al., 2005). Esta espécie vem sendo cultivada com sucesso na Ilha de Santa Catarina e imediações. Este organismo é conhecido por habitar regiões estuarinas e de manguezais, as quais, sabidamente sofrem impactos de contaminantes. Além disto, este molusco apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado desde o sul do Brasil ao Caribe, indicando sua potencialidade de uso em programas de biomonitoramento na América Latina.

As principais características morfológicas da *C. rhizophorae* são valva direita encaixada dentro da esquerda, sendo esta última bastante côncava; margem interna lisa com cicatriz muscular manchada de azul e castanho, disposta

excentricamente (Boffi, 1979). A diferenciação sexual pode ser observada macroscopicamente somente quando os indivíduos estão sexualmente maduros por formações foliculares nas gônadas masculinas e suspensão de ovócitos com aparência granular nas fêmeas (Nascimento; Luneta, 1978).

Estudos realizados por Silva et al. (2001) no estuário do Rio Potengi (RN) mostraram que esta espécie é um bom bioindicador de metais-traço. Rebelo (2001) encontrou uma boa correlação entre os níveis de metais-traço e a expressão do gene da metalotioneína na região da Baía de Sepetiba (RJ). Estudos realizados com esta ostra nativa transplantada para regiões contaminadas na Baía de Todos os Santos (BA) e posteriormente depuradas, mostraram que estes animais têm a capacidade de eliminar alguns metais após 30 dias de depuração (Wallner-Kersanach et al., 2000). Trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que a atividade da acetilcolinesterase em brânquias desta espécie é inibida na presença de carbamatos (Alves et al., 2002), e que a atividade da glutathione S-transferase aumenta de forma dose-dependente em relação à concentração de óleo diesel na água, particularmente entre as salinidades de 15 a 25‰ (Zanette et al., 2003; Silva et al., 2005), e após exposição a efluentes domésticos (Trivella et al., 2004). Além disso, uma análise de enzimas biomarcadoras em ostras do mangue cultivadas na Lagoa de Santa Marta (Laguna, SC) mostraram uma diminuição na atividade de algumas enzimas na presença de níveis mais elevados de metais-traço (Lopes, 2002).

1.4 – Biomarcadores de contaminação

A habilidade dos organismos de sobreviver em ambientes que apresentam compostos tóxicos representa uma adaptação biológica de fundamental importância. As células apresentam uma grande variedade de enzimas capazes de biotransformar compostos químicos tóxicos, de diferentes estruturas e funcionalidades.

A detoxificação enzimática de xenobióticos pode ser classificada em três fases distintas, denominadas fase I, fase II e fase III de biotransformação. Na fase I, ou fase de preparação, destacam-se as reações catalisadas pela família de enzimas citocromo P450 (CYP450), onde moléculas lipofílicas pouco reativas sofrem reações de oxidação, tornando-se ligeiramente mais reativas; deste modo, são alvos mais fáceis para as enzimas da fase II. A fase II ou fase de conjugação, é representada, principalmente, pelo grupo de isoenzimas glutathione S-transferases (GSTs). Esta família de enzimas atua na conjugação dos compostos remanescentes da fase I, formando compostos conjugados com glutathione na forma reduzida (GSH). Os conjugados formados na fase II são, geralmente, menos reativos e de fácil excreção pelos mecanismos da fase III. Uma descrição mais detalhada das GSTs será realizada mais adiante. A fase III ou fase de eliminação é representada por mecanismos de transporte. Diversos sistemas de transporte existem para eliminar conjugados de glutathione, incluindo a bomba GSX ATP-dependente, transportador multi-específico de ânions orgânicos (MOAT), multi específico transportador de ânions de dinitrofenol S-GSH

conjugados (bomba Dnp-SG) e P-glicoproteína (Pgp) (revisado por Sheehan et al., 2001).

As proteínas envolvidas nas fases I, II e III de detoxificação são bastante utilizadas como biomarcadores de contaminação, pois estão diretamente relacionadas aos processos de biotransformação de xenobióticos. Portanto, a indução destas proteínas pode estar relacionada ao aumento da capacidade de biotransformação dos organismos expostos e o grau de contaminação. Por outro lado, a inibição das enzimas de biotransformação também pode ocorrer, por interferência direta ou indireta de certos xenobióticos. Neste caso, poderá ocorrer um bloqueio do processo de biotransformação, gerando danos ao nível celular, fisiológico ou até ecológico (Livingstone, 1988; Smital; Kurelec, 1998; Fiander; Schneider, 1999; Bard, 2000; Ventura et al., 2002; Romeo et al., 2003).

Além dos processos de biotransformação (fase I, II e III) outros mecanismos bioquímicos também estão envolvidos com exposição a xenobióticos, e podem, ser utilizados como biomarcadores de contaminação. Parâmetros relativos a estresse oxidativo, como enzimas antioxidantes, níveis proteicos e níveis de glutatona, são bastante utilizados (Livingstone et al., 1998; Winston; Di Giulio, 1991).

O estresse oxidativo ocorre como consequência da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais são altamente tóxicas para a célula. As EROS são normalmente geradas no metabolismo celular, como decorrência do processo de transferência de elétrons na respiração mitocondrial das células eucariontes aeróbias. Exposição a químicos e os processos de biotransformação, principalmente aqueles relacionados à fase I (reações de CYP450), podem gerar

grandes quantidades de EROS. As enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) atuam de maneira a “neutralizar” estas EROs, visando prevenir danos celulares (Winston; Di Giulio, 1991; Polla; Cossarizza, 1996).

O aumento da produção de EROs em organismos aquáticos tem sido relacionado à contaminação gerada pelo despejo de efluentes nos ecossistemas, podendo resultar em um estado de estresse oxidativo provocado pela exposição aos contaminantes. A atividade das enzimas antioxidantes tem sido proposta como biomarcador de contaminação (Winston; Di Giulio, 1991)

Outra família de proteínas, as heat shock proteins (HSPs) ou proteínas de estresse, também estão relacionadas com a exposição a xenobióticos, porém de forma mais indireta. As HSPs desempenham várias funções nas células, elas estão envolvidas no dobramento de proteínas recém-sintetizadas e na proteção de proteínas danificadas, evitando assim, a formação de aglomerados protéicos. Dentre as HSPs, as isoformas das famílias HSP60 e HSP70 parecem ser moduladas pela exposição dos animais a diferentes classes de contaminantes (Polla; Cossarizza, 1996; Ranson; White; Saibil, 1998; Franco et al., 2006). Outros parâmetros moleculares, relacionados a danos celulares, também são utilizados como biomarcadores de contaminação. São exemplos a análise da peroxidação lipídica (LPO, TBARS) e de dano ao DNA (teste do cometa, formação de adutos) (Di Giulio; Habig; Gallagher, 1993; Canova et al., 1998).

O ICES e o Programa de Biomonitoramento do Mediterrâneo Nordeste (MED-POL), bem como outros programas de biomonitoramento como o BEEP, vem recomendando o uso de alguns biomarcadores específicos. Dentre estes,

estão as enzimas de defesa antioxidante e de conjugação a xenobióticos – principalmente GSTs –, as quais fornecem informações importantes a respeito da capacidade de defesa dos organismos, bem como da capacidade de excreção dos compostos tóxicos (Burgeot et al., 1996).

1.5 – Glutathione S-transferases

1.5.1 – Funções das GSTs

As GSTs são um grupo de enzimas com papel chave na fase II de biotransformação celular. Estas enzimas catalisam a conjugação de moléculas orgânicas, com um centro eletrofílico reativo, com o grupo tiol do tripeptídeo glutathione na forma reduzida (GSH) (Figura 1). Geralmente o resultado desta reação é a formação de uma molécula mais polar e menos reativa, de maior facilidade de excreção (Habig, Jakoby, 1981; Clark, 1989; Mannervik; Jemth, 1999).



Figura 1 - Equação geral da reação catalisada pelas GSTs. Neste exemplo o substrato utilizado é CDNB (1 cloro 2,4 - dinitrobenzeno) (Keen; Jackoby, 1978).

Além disto, foi verificado que as GSTs apresentam muitas outras funções. Estas enzimas possuem atividade de peroxidase e isomerase, podem inativar espécies reativas de oxigênio, regenerar proteínas S-tioladas, catalisar reações de vias metabólicas não associadas às vias de biotransformação, inibir Jun N-terminal quinase (protegendo as células contra morte celular induzida por H₂O₂), e ainda são capazes de ligar, não cataliticamente, uma variedade de ligantes endógenos e exógenos potencialmente tóxicos (revisado por Sheehan et al., 2001). Esta ligação pode ocorrer em um sítio (sítio L), que não é o sítio ativo (sítio G e sítio H); porém em algumas situações ocorre nos sítios catalíticos – principalmente no sítio H, ocasionando a inibição da enzima (Clark, 1989). Os sítios catalíticos e de ligação das GSTs serão discutidos em maiores detalhes adiante.

1.5.2 – Localização

As GSTs são enzimas encontradas no citosol e membranas celulares. Elas são proteínas diméricas, podendo ser homodiméricas ou heterodiméricas (Clark, 1989; Mannervik; Jemth, 1999; Pérez-López et al., 2002 a,b; Timbrell, 2002; Valles; Pereira; Strong, 2003).

Estudos indicam que a estrutura dimérica é essencial para a função catalítica, pelo menos em algumas isoformas. O dímero é formado por interações hidrofóbicas entre os monômeros, através de um sistema “chave-fechadura”. Mutações dirigidas para resíduos envolvidos neste sítio de ligação da proteína podem comprometer a interação dos monômeros, influenciando na estabilidade do

dímero e do sítio ativo, podendo resultar em uma menor interação com o substrato (Codreanu et al., 2005; Alves et al., 2006).

1.5.3 – Isoformas

As GSTs citosólicas de mamíferos são comumente classificadas como isoformas das classes *Alpha*, *Mu*, *Pi* e *Theta*. Estudos independentes, com GSTs de outros grupos de organismos, identificaram novas classes de GST, e algumas destas foram posteriormente encontradas em mamíferos (revisado por Sheehan et al., 2001).

Com base principalmente na comparação de sequências de DNA e de aminoácidos foi proposto que as isoformas da classe *Tetha* foram as primeiras a aparecerem ao longo da evolução, tendo subsequente divergido para formar as classes *Mu* e *Alpha/ Pi* (Pemple; Taylor, 1992).

Estudos com GSTs de moluscos demonstraram maior similaridade com as GSTs da classe *Pi* (Fitzpatrick et al., 1997). Baseado no alinhamento de seqüências de aminoácidos, tem sido sugerido que algumas GSTs purificadas de moluscos pertencem a uma classe a parte, a classe *Sigma* (Beutler; Eaton, 1992).

De modo geral, a classificação das GSTs citosólicas como isoformas da classe *Alpha*, *Mu*, *Pi* e *Tetha* no ponto isoelétrico, especificidade por diferentes substratos, sensibilidade a inibidores, reatividade imunológica cruzada e composição e seqüência de aminoácidos (Clark, 1989; George et al., 1989; Meyer et al., 1991; Board et al., 1997). Os membros de todas as classes exibem tamanho similar dos monômeros (entre 24 e 28 kDa), mostrando alta identidade das

seqüências de aminoácidos (60-80 %) e apresentam especificidade distinta por substrato, porém, muitas vezes, sobrepostas (revisado por Clark, 1989). Alguns exemplos de estrutura das isoformas de GST estão ilustrados na Figura 2.

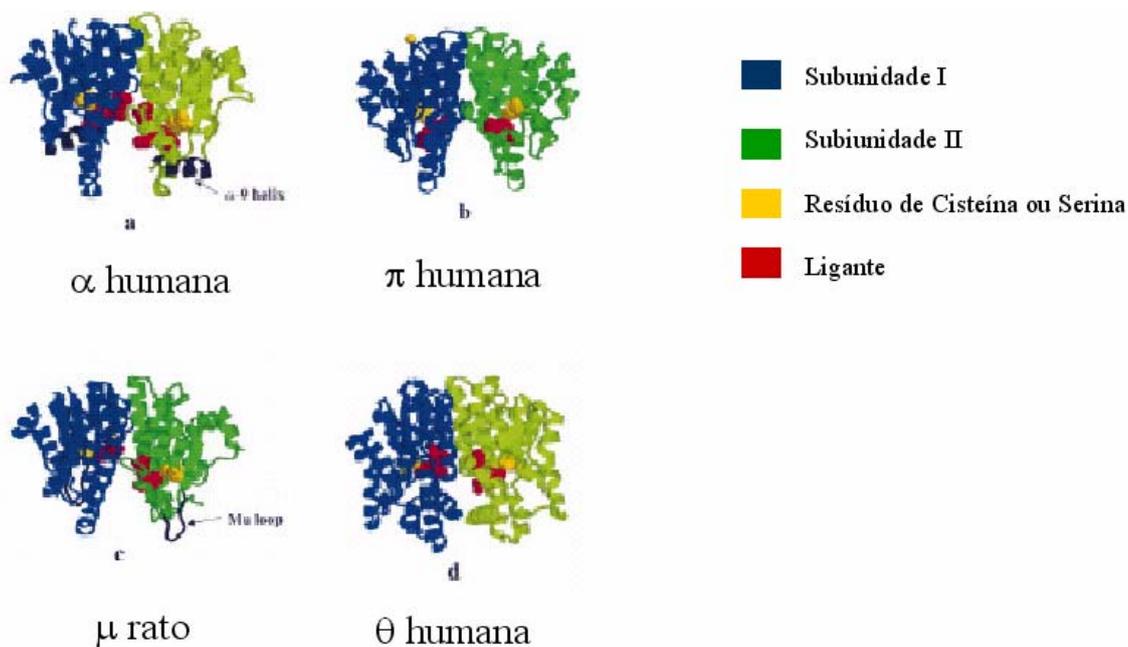


Figura 2 - Estrutura de GSTs de diferentes classes: classe *Alpha* humana, *Pi* humana, *Mu* (μ) de rato e *Tetha* (θ) humana. Destaque para características estruturais específicas de cada classes, como a α -hélice 9 nas classes *Alpha* (α) e o *Mu loop* na classe *Mu* (Sheehan et al., 2001)

1.5.4 – Substratos das GSTs

Os substratos das GSTs incluem epóxidos aromáticos, heterocíclicos, alicíclicos e alifáticos; halogênios aromáticos e nitrocompostos e compostos alifáticos insaturados (Timbrell, 2002).

Tabela 1 - Substratos preferenciais de diferentes isoformas de GST de mamíferos, segundo Boyland; Chasseaud, 1969; Boyland; Speyer, 1970; Chasseaud, 1973; Motoyama; Dauterman, 1979.

Totais -	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB)
Isoforma	
π -	ácido etacrínico (EA) ou (ETHA)
<i>(P)</i>	<i>anti</i> -benzo[a]pireno-7,8-dihidro-9-10-óxido (BPDE)
α -	cumeno hidroperóxido
<i>(Alpha)</i>	
μ -	trans-4-fenil-3-buteno-2-um bromosulfo-ftaleína
<i>(Mu)</i>	1,2-dicloro-4-nitrobenzeno (DTNB) epóxidos
θ -	3,4 - Dicloronitrobenzeno (DCNB)
<i>(Theta)</i>	1,2epóxido 3-(p-nitrofenoxi)propano cloreto de p-nitrobenzil brometo de p-nitrobenzil cumeno hidroperóxido diclorometano
ζ -	ácido etacrínico
<i>(Zeta)</i>	7-cloro-4-nitrobenzeno-2-oxa 1,3 diazol

A atividade específica das isoformas de GST pode ser analisada utilizando-se alguns substratos específicos (Tabela 1). Por exemplo, a classe *Alpha* é altamente reativa ao cumeno hidroperóxido, a classe *Mu* apresenta preferência por epóxidos, a classe *Pi* por ácido etacrinico (ETA) e anti-benzo[a]pireno-7,8-dihidrodiol-9-10-óxido (BPDE); e a classe *Tetha* por brometo de 4-nitrofenetil (revisado por Mannervik; Jemth, 1999; Meyer et al., 1991). Porém, todas as isoformas descritas até o momento apresentam atividade frente ao substrato CDNB.

O co-substrato das GSTs é o tripeptídeo glutationa na forma reduzida (GSH). Esta molécula é formada pelos resíduos Glicina, Cisteína e γ -Glutamil (γ -Glu). A presença do γ -Glu confere proteção anti-proteolítica ao tripeptídeo glutationa. A estrutura da GSH é mostrada na Figura 3.

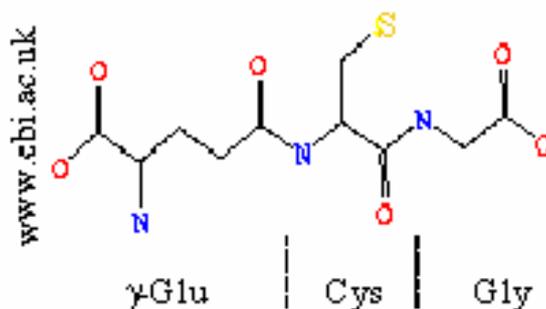


Figura 3 – Estrutura do tripeptídeo Glutationa.

O tripeptídeo GSH possui uma ligação peptídica, uma ligação amida - a qual é resistente a proteases, dois grupos carboxila, um grupo amino e um grupo tiol. O elevado número de grupos hidrofílicos, bem como o baixo peso molecular,

tornam a GSH uma molécula hidrossolúvel. Duas características importantes da GSH são: proteção contra clivagem hidrolítica por proteases, conferida através da ligação amida do resíduo γ -Glutamil; e o elevado potencial de redução ($E^{01} = -0,33$ V) devido à presença de Cisteína (Will, 1999).

1.5.5 - Sítios Ativos

As GSTs apresentam dois sítios catalíticos independentes, o sítio H, responsável pela ligação do substrato hidrofóbico com centro eletrofílico reativo; e o sítio G, envolvido na ligação da GSH com a enzima. O sítio G liga GSH seletivamente, enquanto o sítio H pode acomodar uma variedade de substratos de diferentes tamanhos e polaridades, dependendo da classe de GST em questão (revisado por Clark, 1989). O sítio H, de uma dada isoforma de GST, apresenta uma certa seletividade e especificidade por substratos.

Estas variações de especificidade por substratos ocorrem, principalmente devido a modificações estruturais, por variação na composição de aminoácidos, bem como por alterações na conformação de segmentos que contribuem para a formação do sítio H (Micaloni et al., 2003). Foi verificado que mudanças conformacionais podem ser transmitidas entre os sítios ativos de um monômero para o outro em um dímero, após a interação com o ligante. Este fenômeno parece ocorrer tanto no sítio G (Lo Bello et al., 1998) quanto no sítio H (Oakley et al., 1999), sendo esta uma das razões sugeridas para explicar a ligação de

apenas uma molécula de ligante em um dímero, situação, esta, existente para alguns substratos e/ou inibidores das GSTs.

Além destes dois sítios, classicamente conhecidos, um terceiro sítio, o sítio de interação com ligantes não substratos, ou sítio L, vem sendo proposto. Estudos mais aprofundados em relação a este terceiro sítio de ligação estão sendo realizados com GSTs humanas, onde existe um especial interesse na inibição das GSTs, pois as mesmas biotransformam drogas anti-câncer, diminuindo desta forma a eficiência do tratamento. Estes estudos incluem a utilização de técnicas de cristalografia de proteínas, seguida de análises de difração de raio X, em alta resolução (1.9 - 2.45 Å), permitindo assim o estudo bastante aprofundado da interação de moléculas inibidoras com a GST. No entanto, não existem dados suficientes para afirmar se todas as isoformas de GST apresentam um sítio L. Sugere-se que apenas algumas classes apresentem este sítio de ligação (Micaloni, 2003; Oakley et al., 1999; Oakley et al., 1997 a, b). A localização exata do sítio L também é um pouco discutida, mas, os dados existentes indicam que este sítio está inserido no sítio H e não na interface dos dímero ou no sítio de ligação do tampão (Oakley et al., 1999).

1.5.6 - Genes

Pesquisas realizadas com invertebrados e vertebrados identificaram que o sistema de genes para as GSTs é complexo e envolve mais de um gene. Foi observado que em *Musca domestica* e *Drosophila melanogaster* genes envolvidos

no fenótipo de resistência a inseticidas (inclusive GST) estavam localizados no cromossomo II (revisado por Clark, 1989).

Konish e colaboradores (2005) clonaram e expressaram dois genes de GST, denominados *GSTA1* e *GSTA2*, a partir de seqüências isoladas de *Pagrus major* (*red sea bream*). As ORFs apresentavam 669 e 666 pares de base, codificando 223 e 222 resíduos de aminoácidos, respectivamente.

Doyen; Vasseurç Rodius (2005) clonaram e expressaram uma isoforma da classe *Pi* dos bivalves de água doce *Unio tumidus* e *Corbicula fluminea*. Usando primers específicos identificaram uma ORF de 615 pb, codificando uma proteína de 205 resíduos de aminoácidos.

1.5.7 - Distribuição nos tecidos

A expressão de certas isoenzimas de GST pode ser tecido-específica (Sato et al., 1985; Timbrell, 2002). Horau e colaboradores (2004), demonstraram que diferentes isoformas de GST (pl 5.7 – 6.3) são encontradas em brânquias e glândula digestiva do bivalve do Mediterrâneo *Ruditapes decussatus*, sendo que a atividade da GST frente ao substrato CDNB é 3 a 5 vezes maior nas brânquias que nas glândulas digestivas. No trabalho de Doyen; Vasseur e Rodius (2005), com uma isoforma *Pi* isolada de bivalves de água doce foi verificado diferentes padrões de distribuição nos tecidos. *Unio tumidus* apresentou a mesma distribuição da GST isolada na glândula digestiva, sistema excretório e brânquias; já *C. fluminea* apresentou uma maior concentração desta isoforma na glândula digestiva.

Além disto, outros estudos com moluscos demonstraram que a atividade das GSTs é maior nas brânquias do que em qualquer outro tecido, sugerindo a importância do tecido branquial nos processos de detoxificação (Horau et al., 2002; Romeo et al., 2003).

É importante ressaltar, também, que podem ocorrer variações na atividade de GSTs, relacionada ao estado reprodutivo, sendo os níveis mais elevados ligados à gametogênese e os menores aos períodos de desova (James et al. 1979).

1.5.9 - Interesse no estudo de GSTs

Existe muito interesse em pesquisas sobre GST, devido principalmente ao envolvimento destas enzimas na proteção dos organismos contra compostos tóxicos presentes no meio ambiente (Clark, 1989). Diversos estudos indicam que o grau de expressão de GST é um fator crucial para a determinação da sensibilidade de células a um amplo espectro de contaminantes e a indução da GST é parte de um mecanismo de resposta adaptativa a estresse químico o qual é amplamente distribuído na natureza (Gadagbui; James, 2000; Gowland et al., 2002; Le Penneç; Le Penneç, 2003; Perez-Lopez; Novoa-Valinas; Melagarior, 2002 a, b). As GSTs foram propostas como biomarcadores de contaminação pelo ICES e MED-POL.

Vários estudos têm sido realizados visando a purificação de GSTs. Estas pesquisas visam, principalmente, uma melhor caracterização da enzima, conhecimento das isoformas em uma dada espécie, produção de anticorpos e

iniciadores específicos, conhecimento dos genes que codificam esta enzima, bem como o conhecimento das origens evolutivas das diferentes classes de GSTs nos diferentes *taxa* biológicos (Fitzpatrick et al., 1997).

Vários estudos têm sido realizados visando investigar, ainda, as propriedades bioquímicas e moleculares desta família de isoenzimas (Horau et al., 2004; Valles; Perera; Strong, 2003; Gadagbui; James, 2000).

Diversos programas de biomonitoramento também vem empregando técnicas imunoquímicas para a detecção de biomarcadores específicos. Entretanto, ensaios imunoquímicos exigem a existência de um anticorpo específico para a proteína que está sendo pesquisada, e este anticorpo deve responder bem às proteínas da espécie em estudo. George (1989) testou anticorpos anti GST de coelhos em homogenatos de diferentes espécies de peixes e observou que anticorpos produzidos contra GSTs de uma dada espécie, muitas vezes não reagem ou reagem com baixa especificidade com isoformas de outras espécies. Atualmente, não existem anticorpos comerciais disponíveis para detectar GSTs de moluscos.

2 - OBJETIVO

Purificar e caracterizar a glutathione S-transferase de brânquias da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Molluska: Bivalvia).

2.1 - Objetivos específicos

Determinar as propriedades bioquímicas da(s) proteína(s) purificada(s), analisando:

- a atividade enzimática frente ao substrato CDNB (GST total);
- a especificidade pelo substrato ácido etacrínico (classe *P1*);
- os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da enzima;
- o peso molecular aparente e o ponto isoelétrico;
- a sequência da porção amino terminal da(s) proteína(s) isolada(s) .

3 - JUSTIFICATIVA

A enzima GST vem se mostrando um importante biomarcador de contaminação. No entanto, não existe muita informação quanto às características bioquímicas e moleculares das GSTs de moluscos, organismos que têm sido amplamente utilizados em estudos de biomonitoramento ambiental no Brasil e no mundo.

No Brasil existem grupos de pesquisa utilizando ostras como organismos sentinela de contaminação aquática. Porém, muito pouco se sabe sobre a composição de isoformas que formam a superfamília de GSTs em moluscos. Isto se torna importante, principalmente para a aplicação deste biomarcador em estudos de contaminação aquática, pois a análise de atividade de GST total (substrato CDNB) pode resultar na obtenção de resultados falso-negativos, em relação à indução de GSTs. Isto ocorre pelo fato de que em alguns casos, uma dada isoforma pode estar inibida, enquanto uma outra induzida e desta forma, a variação da atividade de GST total pode não diagnosticar alterações entre diferentes grupos de exposição. Além disto, testes imunquímicos para detecção de GSTs de moluscos são praticamente inviáveis no momento, devido à ausência de anticorpos disponíveis para estes animais.

Esse estudo teve como objetivo purificar a enzima glutathione S-transferase de brânquias de ostras *Crassostrea rhizophorae*, com a finalidade de auxiliar a análise de resultados de inibição/ indução desta família de enzimas em estudos ecotoxicológicos; através da identificação das GSTs presentes nesta ostra, bem

como a identificação da isoforma predominante. Além disto, os resultados obtidos no presente trabalho podem proporcionar alicerces para produção posterior de anticorpos anti-GST de ostras *C. rhizophorae*, os quais poderão ser utilizados em estudos imunoquímicos; bem como o desenho de *primers*, para estudos de transcriptoma e genoma.

4 - MÉTODOS

4.1 - Material biológico

A glutationa S-transferase foi isolada a partir de extratos de brânquias de ostras do mangue da espécie *Crassostrea rhizophorae*. Os animais foram coletados no cultivo de moluscos do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCM) – CCA/ UFSC, na Praia do Sambaqui, Florianópolis/ SC. Foram selecionadas ostras adultas de tamanho médio (\pm 6,0 centímetros de comprimento). O enquadramento taxonômico de *C. rhizophorae*, segundo Barnes (1996), está descrito abaixo.

Filo	MOLLUSCA
Classe	BIVALVIA
Subclasse	PTERIOMORPHA
Ordem	OSTROIDA
Família	OSTREIIDAE
Gênero	CRASSOSTREA

4.2 – Preparação das amostras

As brânquias de *C. rhizophorae* foram extraídas e imediatamente homogeneizadas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, sacarose 0,5M,

KCl 0,15 M, DTT 1mM, PMSF 0,1 mM, em homogeneizador "Tissue Tearor" (Biospec Prod. INC.), na proporção 1 g de tecido para 4 mL de tampão (1:4).

O homogeneizado foi centrifugado a 18.000 x *g* por 20 minutos, obtendo-se frações de sobrenadante e *pellet*. O sobrenadante foi retirado, congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado em freezer à -80 °C.

4.3 - Purificação da GST de brânquias de ostras *C. rhizophorae*

4.3.1 – Cromatografia de exclusão molecular

A purificação da GST das brânquias foi realizada em duas etapas. Primeiramente, o sobrenadante das brânquias foi submetido a uma cromatografia de exclusão molecular, em gel Sephadex G25 fine (Pharmacia). A coluna foi montada segundo as recomendações do fabricante (1 g de resina : 6,5 mL H₂O destilada), equilibrada com tampão PBS (Tampão Fosfato 10 mM pH 7,4; 150 mM NaCl) e mantida em câmara fria a 8°C. O volume final da coluna foi de 18 mL.

A amostra foi então submetida à cromatografia em coluna G25, sendo o volume de amostra aplicada à coluna igual a 1,5 mL. As frações foram então eluídas com tampão PBS 10 mM pH 7,4 e coletadas com um coletor de frações automático (FC203B - Gilson Inc.) ajustado de forma que cada fração apresentava aproximadamente 1,5 mL, mantendo-se um fluxo constante de 10 mL/ hora. A finalidade desta etapa foi, principalmente, equilibrar a amostra com tampão PBS para cromatografia de afinidade (próxima etapa), sendo este, então, considerado um passo preparatório para a purificação da GST. O monitoramento da presença de proteínas foi realizado através da medida da absorbância a 280 nm.

4.3.2 – Coluna GSH – agarose

A cromatografia de afinidade foi realizada em uma coluna de GSH-agarose (Sigma – G-4510). A coluna foi montada de acordo com as recomendações do fabricante (35 mg resina: 70 ml H₂O miliQ), e apresentou um volume final igual a 5 mL. Anteriormente à aplicação da amostra, a coluna foi equilibrada em tampão PBS (10 mM pH 7,4) e o fluxo foi ajustado para 4 mL/ hora. As frações que apresentaram atividade de GST após passagem pela coluna G25 (pico da G25) foram então submetidas à cromatografia de afinidade em coluna GSH agarose. Aproximadamente 1 mL de amostra foi aplicada à coluna GSH agarose e incubadas por 45 minutos antes da eluição. Após a incubação na coluna de afinidade, foi realizada a primeira eluição, utilizando-se tampão PBS.

As frações coletadas foram monitoradas quanto à presença de proteínas, através de leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Após a diminuição de absorvância, referente ao pico de proteínas, a coluna foi eluída com tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 contendo uma elevada concentração de GSH (10 mM). As frações eluídas com Tris-GSH foram então cuidadosamente coletadas e analisadas quanto à presença de proteínas (leitura a 280 nm) e à atividade da GST frente aos substratos 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e ácido etacrínico (ETA). Posteriormente, foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e demais análises, como será descrito a seguir.

4.4 - Diálise

Com a finalidade de remover o excesso de GSH contido nas frações eluídas da coluna de cromatografia de afinidade, foi realizada uma diálise contra água. Primeiramente a membrana de diálise foi fervida em uma solução de Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3) 10 mM, EDTA 1 mM, por um período de 30 minutos. Em seguida, essa membrana foi lavada exaustivamente em H_2O ultra pura e aquecida, com duas trocas de água.

As amostras foram, então, dispostas em sacos de diálise individuais, em um Becker de 1 litro contendo H_2O ultra pura, sobre refrigeração e agitação por um período 12 horas.

4.5 - Determinação da concentração de proteínas totais

Foram utilizados dois métodos distintos para a determinação da concentração total de proteínas.

4.5.1 - Absorbância em luz U.V.

Primeiramente, a concentração de proteínas, em cada fração eluída das colunas de cromatografia, foi monitorada através da leitura da absorbância a 280 nm. Este método é comumente utilizado para monitorar a presença de proteínas em etapas de cromatografia, pois oferece praticidade e agilidade na mensuração, além de ser uma metodologia não destrutiva, ou seja, não altera a composição e estrutura das proteínas na amostra.

O ensaio é baseado na capacidade de absorção dos aminoácidos Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe) e Triptofano (Trp) a 280 nm. No entanto, diferentes proteínas podem apresentar diferentes coeficientes de extinção, devido às respectivas composições de aminoácidos e diferentes concentrações de Tyr, Phe e Trp. O método é baseado na teoria de Wetlaufer (1962), e apresenta sensibilidade de 0,2-2 mg/ml.

A fim de relacionar os valores de absorbância a 280 nm com valores de concentração de proteínas, utiliza-se a razão de absorbância $1,0 = 1 \text{ mg/mL}$, quando a leitura é realizada em cubetas de 1 cm. Este valor é baseado na média de absorção a 280 nm de proteínas distintas, à concentração de 1mg/ml. No entanto, este é apenas um valor estimado, não muito preciso, utilizado apenas como um parâmetro de comparação (Bollag et al., 1996).

A medida foi realizada utilizando-se 1 mL de cada fração para leitura, em cubetas de quartzo de 1 cm, com capacidade para 1 mL de amostra. O equipamento utilizado para este ensaio foi um espectrofotômetro Cary 50 Scan UV visible (Varian Inc.).

Algumas substâncias, no entanto, podem interferir na leitura a 280 nm, tais como ácidos nucleicos, componentes de tampões, etc.. Por estes motivos, existem algumas variações deste tipo de ensaio, também baseados na absorção em luz U.V., porém em outros comprimentos de onda. A relação da absorção a 280 nm e 260 nm (Waburg; Christian, 1962), bem como da absorção a 280 nm e 235 nm (Whitaker; Granum, 1980) e a absorção a 280 nm e 205 nm (Scopes, 1974) são bastante utilizadas, a fim de eliminar a interferência por substâncias não protéicas.

Algumas equações foram desenvolvidas com a finalidade de corrigir tais interferências, são exemplos a equação 1 e a equação 2.

Equação 1 - Correção, por minimização da interferência de ácidos nucleicos, do cálculo da concentração total de proteínas medida a partir da absorvância a 280nm e 260 nm, baseado no método de Schleif, Wensink (1981).

$$[\text{proteína}] \text{ mg/mL} = 1,5 * A_{280} - 0,75 * A_{260}$$

Onde:

[proteína] = concentração total de proteínas

A_{280} = Absorvância a 280 nm

A_{260} = Absorvância a 260 nm

Equação 2 - Correção do cálculo da concentração total de proteínas medida a partir da absorvância a 280nm e 205 nm, baseado no método de Scopes (1974).

$$[\text{proteína}] \text{ mg/mL} = A_{205} / [27,0 + 120 (A_{280} / A_{205})]$$

Onde:

[proteína] = concentração total de proteínas

A_{280} = Absorbância a 280 nm

A_{205} = Absorbância a 205 nm

Obs.: a absorção a 205 nm é 10 a 60 vezes maior que a 280nm, ultrapassando os limites de detecção do espectrofotômetro. Por este motivo, as amostras foram diluídas, e a absorbância a 205 nm foi extrapolada de acordo com tal diluição.

4.5.2 - Método de Lowry

O segundo método utilizado para a determinação da concentração total de proteínas foi o método de Lowry, modificado por Peterson (1983), utilizando albumina soro bovina (BSA) como padrão. Este método é bastante confiável e, ao contrário da medida a 280 nm, apresenta pouca variação para diferentes proteínas. No entanto, apresenta algumas desvantagens, como interferência por uma variedade de substâncias, instabilidade de certos reagentes e desnaturação irreversível das proteínas da amostra. A sensibilidade do método está entre 5 – 100 µg/ ml (Bollag et al., 1996).

Este método é baseado na redução da mistura do cromógeno ácido fosfomolibdico-túngstico com o reagente Folin e Ciocalteu, onde a forma reduzida tem absorção máxima a 750 nm. A mistura do cromógeno ácido é reduzida rapidamente pela reação com os resíduos de aminoácidos aromáticos Tirosina e Triptofano e uma reação mais lenta com cobre quelando a cadeia peptídica ou a cadeia lateral polar, ou ambos (Peterson, 1983).

A concentração total de proteínas na amostra pode ser, então, estimada através da equação 3.

Equação 3 - Cálculo da concentração de proteínas totais, pelo método de Lowry, modificado por Peterson (1983), utilizando-se uma curva padrão de albumina (Peterson, 1983).

$$P \text{ (mg)} = bA(1-aA)^{-1}$$

$$a = \text{med}A^{-1} - b\text{med}P^{-1}$$

$$b = (A_l^{-1} - A_h^{-1}) / (P_l^{-1} - P_h^{-1})$$

Onde:

P = concentração total de proteínas

a e b = constantes calculadas a partir da absorbância de duas concentrações de proteínas do padrão

medA⁻¹ = média de A_l⁻¹ e A_h⁻¹, valores de absorbâncias da menor e maior concentração do padrão, respectivamente

medP⁻¹ = média de P_l⁻¹ e P_h⁻¹, referente à menor e maior concentrações do padrão

No caso de amostras com baixa concentração de proteínas ([prt] <1 µg/mL), pode-se utilizar um sistema de precipitação DOC-TCA (Deoxicolato de Sódio

- Ácido Tricloroacético) (Peterson, 1983). No entanto, os reagentes necessários para este procedimento não estavam disponíveis no laboratório onde este estudo foi realizado. Por este motivo, o método de precipitação de proteínas com acetona foi utilizado, conforme descrito no item 4.6.

Os ensaios foram realizados utilizando-se leitor de microplaca Tecan Sunrise®, em triplicatas. Para cada poço da placa de 96 poços, foi adicionado 95 µL de H₂O deionizada, 5 µL da amostra ou tampão para os brancos, 100 µL da solução de Lowry (CTC 25% - Sulfato de cobre 1%, Tartarato de Potássio 0,2%, Carbonato de Sódio 10%; SDS 2,5%; NaOH 1 N 20%). Após 10 minutos foram adicionados 50 µL do reagente de Folin 0,4 N e mantidas no escuro por 30 minutos e então realizada a leitura a 750 nm.

4.6 - Precipitação de proteínas

Algumas análises realizadas neste trabalho necessitaram de amostras com concentração de proteínas mais elevada do que as encontradas nas frações eluídas das etapas de cromatografia.

Por estes motivos, estas frações tiveram seu conteúdo de proteínas concentrado através do método de precipitação de proteínas com acetona. Neste procedimento, foi utilizado 1 mL de acetona gelada para cada 200 µL de amostra. As amostras eram então mantidas a -20° C por pelo menos 8 horas e então centrifugadas a 18.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso cuidadosamente em 10 µL tampão Tris HCl 10 mM pH 6,8.

4.7 - Análises enzimáticas

A atividade de GST das frações eluídas em todas as etapas de cromatografia foi verificada utilizando o substrato 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e ácido etacrínico (ETA), seguindo o protocolo descrito por Habig; Jackoby (1981), com algumas alterações.

4.7.1 - Substrato CDNB

A atividade de GST frente ao substrato CDNB foi testada usando-se leitor de microplaca Tecan Sunrise®, em placas de 96 poços, ou espectrofotômetro Cary 50 Scan UV Visible (Varian Inc.), em cubetas de 1 cm, em triplicatas. O meio de reação era constituído por tampão Fosfato de Potássio 0,1 M pH 6,5; 1 mM CDNB, 1 mM GSH e 10 µL de amostra ou tampão de eluição (para o branco). Os ensaios foram conduzidos à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). O volume final em cubetas de 1 cm foi igual a 1 mL, já em microplaca foi igual a 0,1 mL. A conjugação de GSH com CDNB foi acompanhada através da formação de um composto amarelado, detectado a 340 nm, por um período de 5 minutos. Os valores foram expressos em variação da absorbância por minuto e em seguida calculada a atividade e atividade específica, expressa em unidades por mililitro (U/mL) e em unidade por miligrama de proteínas (U/mg prt), onde uma unidade representa 1 µmol de substrato conjugado por minuto, conforme mostrado na equação 4.

Equação 4 - Cálculo atividade CDNB.

$$\text{Atividade} = ((\text{Abs}/\text{min}/\varepsilon * V_{\text{total}}) / V_{\text{amostra}})$$

$$\text{Atividade específica} = ((\text{Abs}/\text{min}/\varepsilon * V_{\text{total}}) / ([\text{prt}] * V_{\text{amostra}}))$$

Onde:

ε = coeficiente de extinção molar do conjugado CDNB:GSH a 340 nm = 9,6 (mM cm)⁻¹ para microplaca em 100 μ L = 0,3 cm, logo $\varepsilon_{\text{CDNB}}$ neste ensaio é 2,8 (mM cm)⁻¹.

V_{total} = volume final da reação (mL)

V_{amostra} = volume de amostra aplicado na reação (mL)

$[\text{prt}]$ = concentração total de proteínas, determinada pelo método de Lowry (mg/mL).

O CDNB é utilizado para analisar a atividade de todas as isoformas de GST. Portanto a atividade detectada com este substrato é denominada atividade da GST total. Já o ácido etacrínico foi relatado ser um substrato utilizado preferencialmente por isoformas de GST da classe *Pi* (Mannervick; Jemth, 1999; Meyer et al., 1991).

4.7.2 - Substrato Ácido etacrínico (ETA)

A dosagem enzimática da atividade de GST frente ao substrato ETA foi realizada em espectrofotômetro Cary 50 Scan UV Visible (Varian Inc.). O meio de reação continha tampão Fosfato de Potássio 0,1 M, pH 6,5; 0,2 mM ETA, 1 mM GSH, e 20 µL de amostra ou tampão de eluição (para o branco). O ensaio foi conduzido à temperatura controlada (25°C) durante 2 minutos. Os valores obtidos estão apresentados como atividade enzimática e atividade específica, expressas em unidade (U) e em U/ mg de proteínas, respectivamente, conforme mostrado na equação 5.

Equação 5 - Cálculo atividade ETA.

$$\text{Atividade} = ((\text{Abs}/\text{min}/\varepsilon * \text{Vtotal}) / \text{Vamostra})$$

$$\text{Atividade específica} = ((\text{Abs}/\text{min}/\varepsilon * \text{Vtotal}) / ([\text{prt}] * \text{Vamostra}))$$

Onde:

ε = coeficiente de extinção molar do conjugado ETA:GSH a 270 nm = 5,0
(mM cm)⁻¹

Vtotal = volume final da reação (mL)

Vamostra = volume de amostra aplicado na reação (mL)

[prt] = concentração total de proteínas, determinada pelo método de Lowry
(mg/mL)

4.7.3 - Determinação de parâmetros cinéticos (K_m e V_{max})

A determinação de parâmetros cinéticos como constante de afinidade por substrato (Constante de Michaelis-Menten - K_m) e velocidade máxima (V_{max}) são importantes na caracterização de uma determinada enzima. Neste trabalho, foram selecionadas frações que representavam o pico de eluição dos processos de purificação para a realização da cinética ($n=4$). Os ensaios foram realizados em microplaca, utilizando-se o leitor Tecan Sunrise®.

Foram testadas diferentes concentrações de CDNB e GSH. Primeiramente a concentração de GSH foi fixada em 1mM e a concentração de CDNB variada em 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mM. Posteriormente, fixou-se a concentração de CDNB em 1 mM e variou-se a concentração de GSH em 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mM. O cálculo dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4®, usando-se os seguintes parâmetros:

Equação 6: Cálculo dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} - one site binding (hiperbola).

$$Y = B_{max} * X / (K_d + X)$$

Onde:

$$B_{max} = V_{max}$$

$$K_d = K_m$$

Y = Atividade da enzima

X = Concentração do substrato testado

Esta equação descreve a ligação de um ligante ao seu receptor, seguindo a lei da ação das massas, onde V_{\max} representa a taxa máxima de ligação e K_m a concentração de ligante necessária para atingir a metade de V_{\max} .

4.8 - Eletroforese

4.8.1 - Eletroforese em mini gel PAGE/SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (PAGE/SDS) é uma técnica amplamente utilizada em análise de proteínas. Esta técnica permite determinar a massa molecular aparente de proteínas em uma determinada amostra, bem como o grau de pureza da mesma, em caso de etapas de purificação. O método consiste na aplicação de uma determinada amostra contendo misturas de proteínas e/ou proteínas purificadas ou parcialmente purificadas e posterior separação das mesmas de acordo com a massa molecular. As amostras são preparadas previamente em um tampão denominado “tampão de preparação da amostra” (*sample buffer*) o qual contém detergentes, geralmente utiliza-se Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), agentes redutores, como DTT ou β -mercapto etanol e um corante, geralmente azul de bromofenol (Bollag et al., 1996).

O SDS se liga às proteínas da amostra, rompendo as ligações envolvidas no dobramento da proteína, permitindo que a mesma se mantenha estável em

solução, em uma conformação linear. Como resultado, o tamanho do complexo SDS-proteína é proporcional à massa molecular da proteína (Bollag et al., 1996). Além disto, o SDS envolve estas proteínas, conferindo-lhes carga negativa.

Deste modo, é possível separar as proteínas de uma determinada amostra por massa molecular, após aplicação de uma carga elétrica no sistema e a formação de uma diferença de potencial elétrico, fazendo com que as proteínas, previamente carregadas negativamente, migrem em direção ao pólo positivo. Assim sendo, proteínas de maior massa migram menos no gel, concentrando-se na porção superior, enquanto proteínas menores migram mais rapidamente, sendo encontradas na porção inferior do gel.

A fim de verificar o grau de pureza das frações eluídas da coluna GSH-agarose, foi realizado PAGE/SDS em gel 15%. As amostras foram previamente concentradas com acetona, conforme descrito anteriormente, e então ressuspensas em 10 μ L de Tampão Tris 10 mM pH 6,8. Essas frações concentradas foram, então, submetidas ao tratamento com tampão de amostra (Tris 0,25 M pH 6,8, glicerol 40%, SDS 4%, Azul de Bromofenol 0,008%) contendo 5% de β -mercapto etanol. Para cada 10 μ L de amostra foi utilizado 15 μ L de tampão de amostra. As amostras foram fervidas por 3 minutos, refrigeradas em gelo e então aplicadas no gel (25 μ L/ poço).

Um sistema de eletroforese mini gel da Bio-Rad foi utilizado. O gel de entrada (*stacking gel*) apresentava concentração de 5% e o gel de corrida (*running gel*) de 15%. O tampão de corrida (*running buffer*) utilizado foi um tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 192 mM, SDS 0,1%. O sistema foi mantido com uma voltagem constante de 80 V até que todas as amostras atingissem o gel de

corrida, aumentando-se então a voltagem para 120 V, monitorando-se a temperatura para evitar um superaquecimento. Foram utilizados padrões de massa molecular purificados como valores referência, além de um marcador de massa colorido (Kaleidoscope® – Bio-Rad Inc.).

Após o término da corrida, os géis foram fixados em uma solução contendo Metanol 50 %, Ácido Acético 12%, Formaldeído 0,25 mL/ L. Os géis foram então mantidos nesta solução fixadora por um período de pelo menos 12 horas. As bandas de proteína puderam ser visualizadas após coloração por prata, conforme descrito no item 4.8.3.

4.8.2 – Eletroforese Bidimensional (2D)

Os procedimentos relacionados à eletroforese bidimensional foram realizados no Laboratório de Química de Proteínas (Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas/ SP), sob a coordenação do Prof. Dr. José Camillo Novello.

A determinação do peso molecular aparente e ponto isoelétrico das proteínas purificadas foi realizada utilizando um sistema de eletroforese bidimensional (eletroforese 2D). Esta técnica é constituída de duas etapas, sendo a primeira caracterizada pela separação de proteínas pelo ponto isoelétrico (pI), também denominada isoeletrofocalização; e a segunda pela análise da massa molecular aparente destas proteínas previamente separadas por pI. Deste modo, a utilização de eletroforese bidimensional permite estabelecer o pI e a massa molecular aparente das proteínas contidas em uma determinada amostra. Os

procedimentos adotados para a realização da eletroforese 2D neste trabalho estão descritos, em detalhes, a seguir.

Isoeletrofocalização (primeira dimensão)

Foram utilizadas tiras desidratadas de poliacrilamida de 18 cm com gradiente imobilizado de pH (IPG, immobilized pH gradient - Pharmacia) na faixa de pH de 3-10, não linear. Cada tira foi re-hidratada diretamente com 350µL da solução SB1D (Uréia 8M, Caps 4%, DTT 5mM, Anfolinas 2% e um traço de BPB) (com a amostra) por 12 horas. Em seguida, as tiras foram submetidas à corrida eletroforética em aparelho IPGphor (GE Biosciences) com os seguintes parâmetros elétricos:

Passo 1: 500V por 1 hora

Passo 2: 1000V por 1 hora

Passo 3: 8000V ate acumular-se 90 KVh

(máximo de 50µA por tira).

Ao final da corrida, as tiras foram imediatamente submetidas à separação na segunda dimensão ou armazenadas a -80°C para posterior utilização.

SDS-PAGE (segunda dimensão)

Foi utilizado o sistema SE-600 com refrigeração interna (GE Biosciences). Os géis de poliacrilamida 13,5% foram preparados no dia anterior à corrida, em placas de 14 X 16cm, com espessura de 1,5 mm.

Previamente ao início da corrida, as tiras de IPG, provindas da corrida de primeira dimensão, foram incubadas por 8 minutos em solução contendo Tris-HCl 50mM pH 6,8, Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2% e DTT 2%. Em seguida, foram transferidas para uma solução contendo Tris-HCl 50mM, pH 6,8, Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2% e Iodoacetamida 2,5%, por um período de 12 minutos. Finalmente, foi adicionado às tiras 200 μ L de Tris 6,8, por mais 12 minutos, a fim de configurar a isotacoforese. As tiras foram então aplicadas sob os géis previamente preparados e, então, cobertas com agarose 0,1% aquecido a 70°C. Após solidificação da agarose, as placas foram montadas no sistema SE-600 e devidamente completadas com tampão de corrida (Tris-HCl 25mM, Glicina 192mM e SDS 0,1%). A corrida foi conduzida a 10°C, inicialmente a 90V fixos por 30 minutos e depois com amperagem constante de 30mA /gel e voltagem livre por aproximadamente 3 a 4 horas. Ao final da corrida, os géis foram agitados por 5 minutos em água destilada para retirada do SDS e fixados durante a noite em metanol 40% e ácido acético 10%.

4.8.3 - Coloração com Nitrato de Prata

A coloração por prata é ideal para a visualização de bandas contendo entre 2 a 10 ng de proteína. Como as frações eluídas da coluna GSH-agarose estavam pouco concentradas, foi utilizado este método de coloração para visualização das bandas de proteínas, tanto em eletroforese em mini gel, como em eletroforese bidimensional. Os procedimentos adotados estão de acordo com o relatado por

Blum e colaboradores (1987), com algumas modificações (Nesterenko; Tilley; Upton, 1994), como descrito a seguir.

Primeiramente, o gel foi incubado por 20 minutos em uma solução de etanol 50%, este procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, o gel foi transferido para uma solução de tiosulfato de sódio (0,06g/300ml H₂O) por 1 minuto, seguido de três lavagens de 20 segundos com água destilada. O gel foi então incubado com uma solução impregnante, contendo nitrato de prata (0,6g AgNO₃ e 225µL formaldeído para 300mL) por 20 minutos, seguido de três lavagens de 20 segundos com água destilada. Finalmente, foi realizada revelação em 400 mL de solução contendo 24g de Na₂CO₃, 200µL de Formaldeído e 16mL da solução de Tiosulfato. A revelação foi interrompida com 200mL de ácido acético 5% por 10 minutos.

4.9 - Sequenciamento da porção N- terminal

As proteínas separadas por eletroforese 2D foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivimilideno (PVDF). (Immobilon-PSQ , Millipore, Bedford, MA), segundo descrito por Valles; Pereira; Strong (2003) ou Immobilon-P transfer membrane in 10 mM MES (pH 6.0)/ 20% metanol em um sistema *Bio-Rad Transfer Trans-Blot cell blotting system*. As bandas reveladas por azul de comassie foram cortadas e submetidas à análise da seqüência N- terminal em seqüenciador automático Shimadzu (PPSQ-23A). As análises de sequenciamento

foram conduzidas no Laboratório de Bioquímica (Instituto de Biologia-UFSCar, São Carlos/ SP), sob coordenação da Profa. Dra. Heloísa Sobreiro S. de Araújo.

O método de sequenciamento utilizado foi baseado na reação de degradação de Edman. Nesta reação o Fenilisotiocianato (FITC) reage com o resíduo amino terminal em condições alcalinas, para formar um derivado de Feniltiocarbamoil (FTC-proteína). O ácido Trifluoroacético cliva o primeiro aminoácido como um derivado de Anilinoalinalona (ATZ- aminoácido), deixando um novo resíduo de aminoácido na posição N-terminal para o próximo ciclo de degradação. O ATZ- aminoácido é então removido por extração com cloreto de N-butil e convertido a um derivado de Feniltiohidantoína (FTH - aminoácido). O FTH - aminoácido é transferido para uma coluna de fase reversa (C-18) para detecção a 270 nm. Uma mistura de 19-FTH aminoácidos padrões é também injetada na coluna para separação (Lehninger; Nelson; Cox, 1995).

Os cromatogramas do HPLC foram coletados usando análises computacionais. Esta cromatografia permite identificar o tempo de retenção dos padrões conhecidos, para posterior comparação com os aminoácidos derivados dos ciclos de degradação de Edman do peptídeo analisado e assim, determinar o aminoácido presente em um resíduo em particular. Este processo é repetido seqüencialmente para determinar a seqüência N-terminal de uma proteína/ peptídeo. Esta metodologia pode ser utilizada em proteínas imobilizadas em membranas de PVDF. A amostra deve estar o mais concentrada possível na membrana ($\pm 1 \mu\text{g}/ \text{spot}$). Os *spots* podem estar corados com azul de comassie, Ponceau S ou Amido Black (Iowa State University of Biotechnology, 2004).

5 - Resultados

As etapas de purificação e caracterização da GST de brânquias de ostras *Crassostrea rhizophorae* foram realizadas com repetições e os resultados apresentados refletem o padrão encontrado nas análises.

5.1 – Purificação da GST

5.1.1 – Gel filtração

A cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G25 apresentou dois picos de proteínas, como pode ser verificado na Tabela 2 e no gráfico da Figura 4. Este perfil de eluição está de acordo com o esperado para amostras com conteúdo heterogêneo de proteínas.

As frações que apresentaram os picos de proteínas foram agrupadas e submetidas às análises bioquímicas a fim de verificar a presença de atividade de GST. A atividade de GST nos picos foi verificada utilizando-se o substrato CDNB, que quantifica a atividade de todas as isoformas de GST.

Tabela 2 – Atividade de GST utilizando-se o substrato CDNB (U/ min) de frações eluídas da gel filtração com tampão PBS.

Pico	Alíquota (Frações)	Absorbância 280 nm	Atividade GST (U/ mL)
Pico I	I (F8-10)	2,71	0,29
	II (F11-13)	> 3	0,35
	III (F14-16)	1,78	0,31
Pico II	IV (F17-19)	2,88	0,11
	V (F20-22)	> 3	0,03
	VI (F23-25)	1,78	0,01

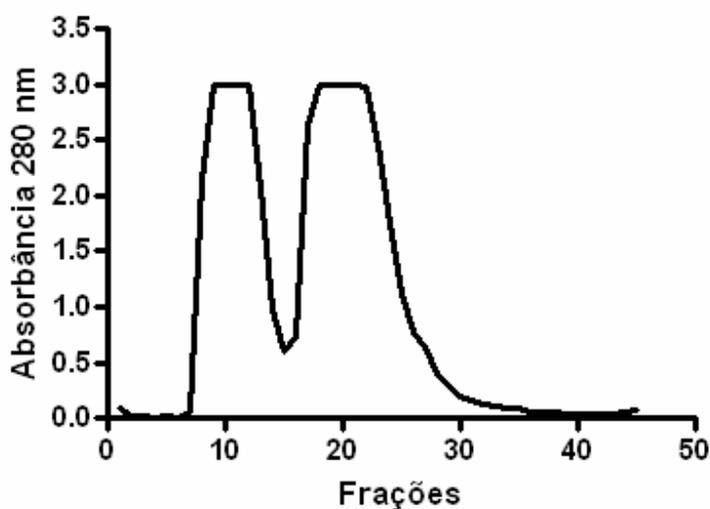


Figura 4 – Perfil de eluição de proteínas durante a gel filtração do extrato bruto de brânquias de ostras *C. rhizophorae*, monitorando a absorbância a 280nm. O valor limite para detecção da absorbância no espectrofotômetro utilizado foi 3,0.

As alíquotas I, II e III apresentaram as maiores atividades de GST-CDNB nos repetidos processos de gel filtração realizados neste trabalho (Tabela 2), correspondendo às amostras do primeiro pico de proteínas das frações eluídas da

coluna (gráfico da Figura 4). Os valores médios de atividade enzimática no primeiro pico de proteínas foi igual a 0,32 mmol/ min (\pm 0,03). No segundo pico a atividade foi de 0,05 mmol/ min (\pm 0,05).

5.1.2 – Cromatografia de afinidade

As alíquotas com atividade de GST provenientes da coluna G25 foram então submetidas à cromatografia de afinidade em coluna GSH-agarose. Foi aplicado um volume de 800 μ L de amostra a esta coluna, seguida de incubação por 45 minutos, anteriormente ao início da eluição com tampão PBS.

As frações eluídas com tampão PBS da coluna GSH-agarose apresentaram um pico de proteínas entre as frações 4 e 14 (Figura 5). Este perfil cromatográfico foi similar em todas as repetições da cromatografia, quando mantidas as mesmas condições experimentais.

Quando a absorvância a 280 nm das amostras diminuiu aos níveis basais, foi realizada a eluição das amostras da coluna com tampão Tris-GSH (GSH 10 mM). Após a esta eluição, foi observado o aparecimento de um pico de proteínas a partir da fração 28.

Estes resultados demonstram a presença de uma grande quantidade de proteínas, na amostra, sem capacidade de ligação a GSH, as quais foram eluídas com PBS. Uma menor quantidade de proteínas, provavelmente GSTs, ficaram retidas na coluna durante a eluição com PBS e somente foram eluídas após a utilização do tampão Tris com elevada concentração de GSH (10 mM).

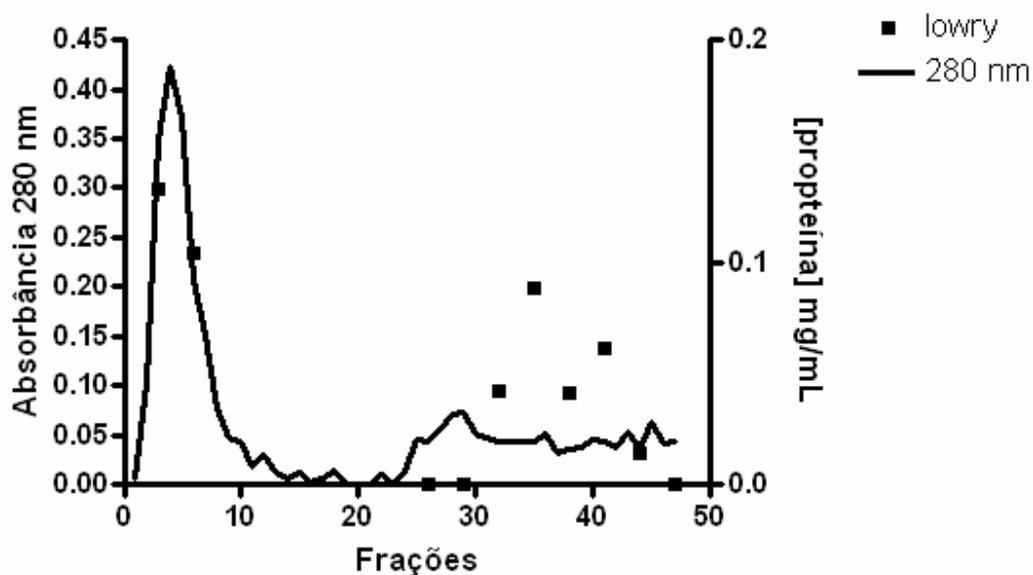


Figura 5 – Frações eluídas da cromatografia de afinidade GSH-agarose monitorado através da leitura da absorbância a 280 nm e pela quantificação utilizando-se o método de Lowry.

5.2 - Diálise

Inicialmente as alíquotas eluídas foram dialisadas para eliminar o excesso de GSH no meio visando a quantificação da atividade da GST. No entanto após o processo de diálise foi observada uma diminuição na atividade da GST em cerca de 10 vezes em relação à amostra não dialisada (dados não mostrados). Possivelmente isto ocorreu devido ao longo período de diálise utilizado (12 horas). Em função disso, as demais análises foram realizadas com frações não dialisadas.

5.3 - Dosagem de proteínas

O monitoramento da presença de proteínas através de espectrofotometria a 280 nm é uma metodologia prática, porém não muito sensível para a quantificação precisa da concentração de proteínas em uma determinada amostra. Por este motivo, o método de Lowry modificado por Peterson (1983) também foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais nas frações eluídas da coluna de afinidade GSH-agarose.

As frações eluídas da cromatografia apresentaram uma pequena concentração de proteínas. A metodologia de Peterson (1983) para a determinação da concentração total de proteínas pode sofrer interferência causada pela presença de Tris e GSH na solução. Para que pudéssemos utilizar esta metodologia, foi necessária a realização de três curvas padrões, com a finalidade de observar o padrão de absorbância de concentrações conhecidas de albumina sérica em soluções contendo água, tampão Tris 50 mM e tampão Tris 50 mM com GSH 10 mM (Figura 6), respectivamente.

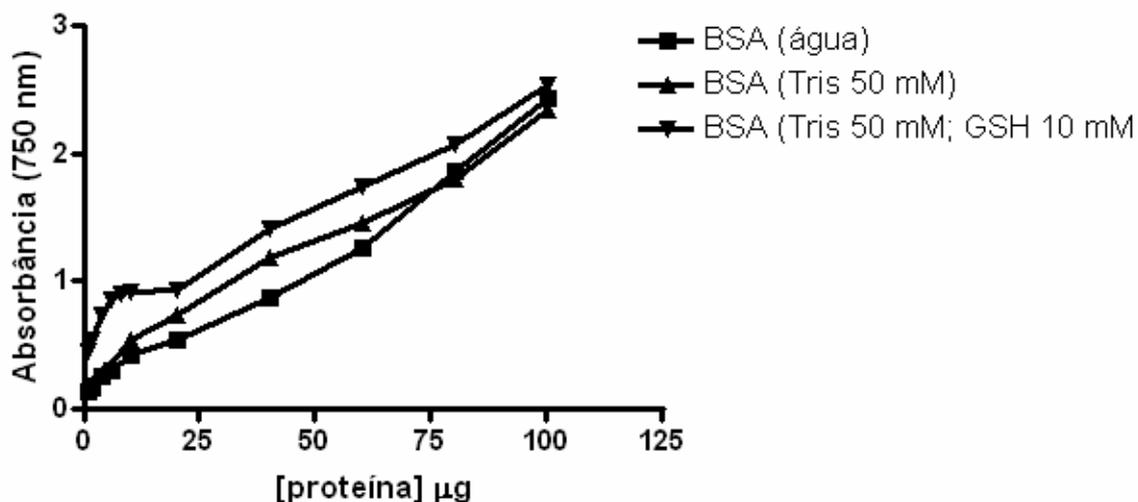


Figura 6 - Curva padrão de dosagem de proteínas, utilizando albumina sérica como padrão em diferentes soluções.

Como pode ser observado na Figura 6, o tampão de eluição Tris-GSH interfere na leitura pelo método de Peterson (1983), devido à presença de Tris e GSH. A interferência de GSH é bastante significativa quando a concentração de proteínas é baixa (<10 µg ou <40 µg/ mL), podendo aumentar em até 3 a 4 vezes a absorbância a 750 nm. Já em concentrações elevadas de proteína, a interferência destes reagentes é menor.

Face ao exposto e devido ao fato das frações eluídas da coluna de afinidade conterem baixa concentração de proteínas, foi necessária a realização de uma precipitação com acetona para concentrar as proteínas nestas frações. Assim, foi possível minimizar a interferência de Tris e GSH e aumentar a concentração de proteínas nas amostras,

Como pode ser observado na Figura 5, a estimativa da concentração total de proteínas determinada pelo método de Lowry permitiu a detecção de um

primeiro pico de proteínas nas frações iniciais, eluídas com PBS, bastante similar ao encontrado através da quantificação a 280 nm; e um segundo pico nas frações eluídas com Tris-GSH. No entanto, o segundo pico de proteínas, não pôde ser muito bem destacado através da absorvância a 280 nm. Utilizando o método de Peterson (1983) foi possível evidenciar a presença do segundo pico de proteínas eluídas com tampão Tris-GSH.

Métodos alternativos para a detecção da concentração total de proteínas por luz u.v. também foram testados. Foram realizadas medidas a 280, 260 e 205 nm. Os cálculos foram realizados conforme descrito nas equações 1 e 2 (metodologia). Os valores de concentração total de proteínas calculados pelo método de Peterson (1983) e por medição em luz u.v. foram bastante distintos, porém mantiveram uma certa relação entre as diferentes amostras, como pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação do cálculo para determinação da concentração total de proteínas, nas diferentes metodologias utilizadas.

	[proteínas] mg/mL		
	Lowry	uv 280/205	uv 280/260
amostra 1	0,088026	0,2216264	0,23115
amostra 2	0,013714	0,207311	0,217725

Para as demais análises bioquímicas foram utilizados os valores de concentração total de proteínas resultantes do ensaio pelo método de Peterson (1983).

5.3 - Análises enzimáticas

Com o intuito de verificar a presença de atividade de GST nas frações eluídas da coluna de cromatografia de afinidade, foram realizadas análises da atividade da GST nas alíquotas referentes ao pico de proteínas, utilizando-se CDNB e ETA como substratos (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade enzimática frente ao substrato CDNB e ETA e concentração total de proteínas (Lowry) das frações que representavam os picos de eluição com PBS e Tris-GSH. Os picos de atividade estão em negrito, *nd* = não detectado (U= $\mu\text{mol}/\text{min}$).

Fração	CDNB 1 mM; GSH 1 mM			ETA 0,2 mM; GSH 1 mM			[prt]
	Od/min	U/ mL	U/ mg prt	Od/min	U/ mL	U/ mg prt	mg/mL
PréGSH	0,0453	0,472	0,152	0,0112	0,112	0,0359	3,1020
F2.3e4	0,0153	0,159	1,196	0,0119	0,119	0,8929	0,1333
F5.6e7	0,0177	0,184	1,772	0,0009	0,009	0,0913	0,1041
F25.26e27	0,0202	0,210	nd	0,0010	0,010	nd	nd
F28.29e30	0,0212	0,220	nd	0,0010	0,010	nd	nd
F31.32e33	0,0049	0,051	1,214	nd	nd	nd	0,0421
F34.35e36	0,0113	0,117	1,332	0,0064	0,064	0,7271	0,0880
F37.38e39	0,0083	0,087	2,095	0,0312	0,312	7,5546	0,0413
F40.41e42	0,0268	0,279	4,581	0,0301	0,301	4,9294	0,0610
F43.44e45	0,0186	0,194	14,134	0,0015	0,015	1,0573	0,0137
F46e47	0,0059	0,061	nd	0,0139	0,139	nd	nd

5.3.1 - Atividade da GST-CDNB

A amostra denominada PréGSH, representa a alíquota selecionada da coluna G-25 e então submetida à cromatografia de afinidade. Esta amostra apresentou uma atividade da GST-CDNB de 0,472 U/ mL. No entanto, a atividade específica de GST-CDNB total na PréGSH foi significativamente menor que nas frações eluídas com tampão Tris-GSH (cerca de 30 vezes menor que em F40-42 e 93 vezes que em F43-45), evidenciando a eficiência da cromatografia de afinidade (Figura 7 e Tabela 4).

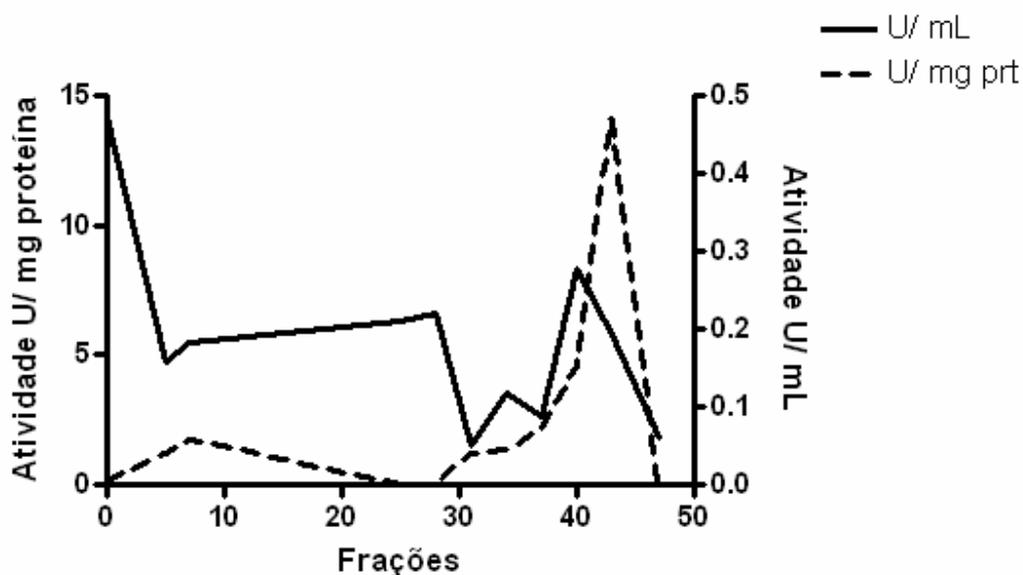


Figura 7 - Atividade enzimática e específica da GST-CDNB nas frações eluídas da coluna GSH-agarose. Os dados estão plotados em U/ mL e em U/ mg de proteína (U = $\mu\text{mol/ min}$).

5.3.2 - Atividade da GST-ETA

Ao contrário do CDNB, o ETA é somente utilizado como substrato por algumas isoformas de GST, principalmente aquelas pertencentes à classe *Pi*. Utilizando-se o ETA como substrato foram observadas duas frações de atividade (Figura 8 e Tabela 4), de forma semelhante ao observado para o CDNB. Porém, o pico de atividade GST-ETA nas frações eluídas com Tris-GSH, foi observado em uma alíquota de eluição anterior à fração inicial do pico de atividade com CDNB, sugerindo que estas isoformas possuem diferentes constantes de afinidade por GSH-agarose.

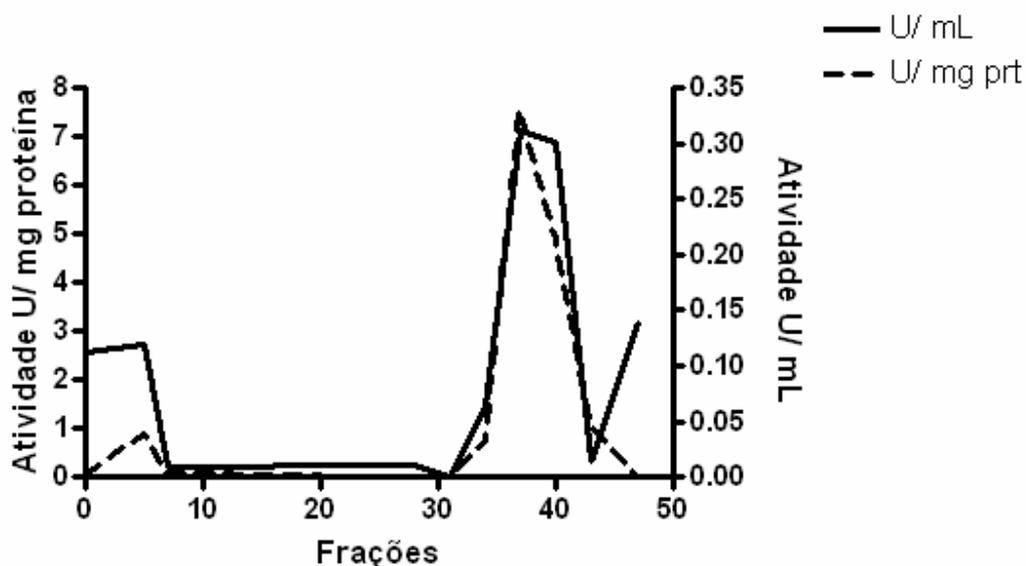


Figura 8 - Atividade enzimática e específica da GST-ETA nas frações eluídas da coluna GSH-agarose. Os dados estão plotados como U/ mL e U/ mg de proteína (U = $\mu\text{mol}/\text{min}$).

As atividades enzimáticas e específicas de GST-ETA nas amostras eluídas da coluna GSH-agarose foram cerca de 130 (F40-42) e 200 (F37-39) vezes maiores do que nas frações obtidas da coluna de G25. Estes resultados sugerem a presença de isoformas de GST pertencentes à classe *Pi* em brânquias de *C. rhizophorae*.

A utilização da unidade U/ mg de proteína é válida, pois reflete a relação das proteínas contidas na amostra e o grau de purificação do processo. Porém, deve-se ter cautela ao analisar os resultados, pois em alguns casos, a concentração de proteínas totais é muito próxima a zero, mascarando a atividade real da enzima, na amostra analisada.

Pelo fato dos picos de atividade de GST-CDNB e GST-ETA das frações eluídas com Tris-GSH apresentarem baixa concentração de proteínas, pode-se sugerir que as proteínas contidas nas frações do pico eram GSTs. Investigações adicionais foram realizadas para checar o grau de pureza destas amostras. Estas amostras foram submetidas a eletroforese (PAGE/SDS) e eletroforese bidimensional, como descrito posteriormente.

5.3.3 – Parâmetros cinéticos da GST purificada

As frações representativas dos picos de eluição de GST foram então submetidas a análises de cinética enzimática, com a finalidade de estabelecer os valores de K_m e V_{max} para os substratos CDNB e GSH, das proteínas isoladas.

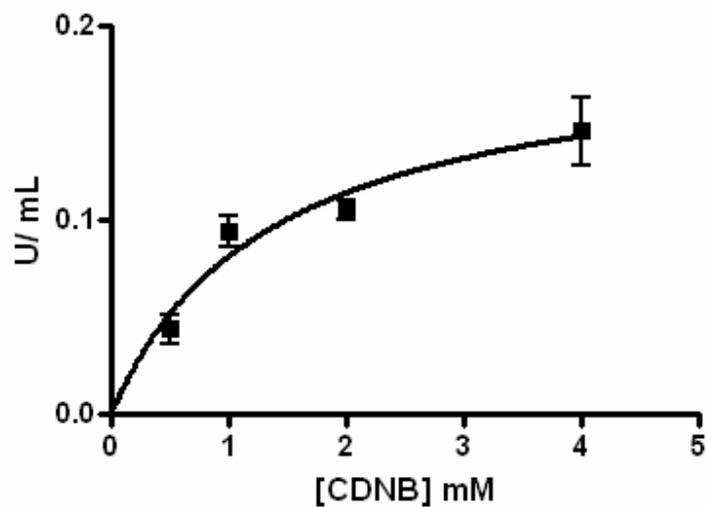


Figura 9 - Atividade de GSTs, isoladas por cromatografia de afinidade, utilizando-se GSH 1 mM e diferentes concentrações do co-substrato CDNB (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mM) (n=4).

Os valores de V_{\max} e K_m calculados, conforme a equação 6, para CDNB foram $0,1926 (\pm 0,0292)$ mmol/ min e $1,37 (\pm 0,51)$ mM, respectivamente.

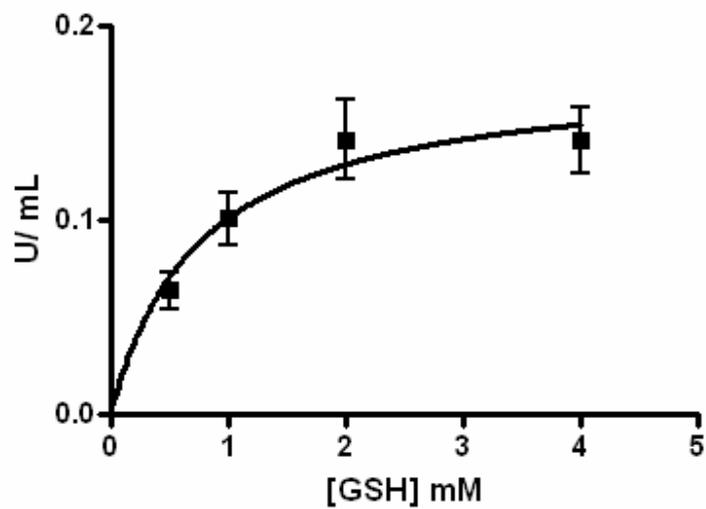


Figura 10 - Atividade de GSTs, isoladas por cromatografia de afinidade, utilizando-se o co-substrato CDNB em 1mM e diferentes concentrações do substrato GSH (1,0; 2,0 e 4,0 mM)(n=4) .

Os valores de V_{\max} e K_m encontrados para GSH foram $0,1779 (\pm 0,0265)$ mmol/ min e $0,767 (\pm 0,355)$ mM, respectivamente.

5.4 - Eletroforese

5.4.1 - Eletroforese PAGE/SDS

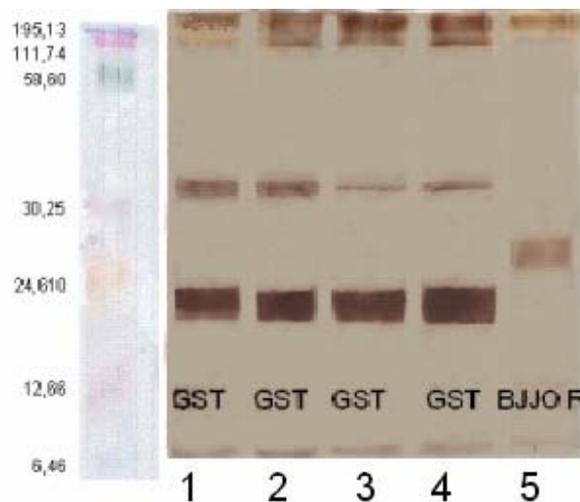


Figura 11 - PAGE/SDS 15 % das alíquotas obtidas no pico da cromatografia em coluna de afinidade. À esquerda pode ser visualizado o marcador de peso molecular kaleidoscope (Bio-rad) com as respectivas massas moleculares. As linhas 1,2,3 e 4 representam as frações eluídas, e a linha 5 o marcador de massa purificado BJJO de 25 kDa. Coloração por Prata.

O perfil das frações purificadas, em mini gel, mostrou a presença de uma quantidade de proteínas com massa molecular aparente próxima a 24 kDa. Estas frações apresentaram, também, pouca contaminação, refletida pela ausência de outras bandas de proteínas com massas moleculares distintas, sendo que as bandas detectadas por esta metodologia foi uma de massa molecular próxima a 40 kDa e outra próximo a 195 kDa.

Os valores de massa molecular aparente não puderam ser precisamente calculados em eletroforese em minigel, no entanto, esses valores foram melhores estabelecidos após a realização da eletroforese bidimensional.

5.4.2 - Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional das alíquotas obtidas no pico das frações eluídas da coluna GSH-agarose revelou a presença de seis *spots* de massa molecular aparente calculada em 26,09 kDa (vide Tabela 5) e pI entre 5,4 e 7,6, representando, provavelmente seis subunidades (monômeros) diferentes de GST. Outros *spots* de massa molecular aparente de 55,15 e 68,50 kDa podem ser visualizados na parte superior do gel.

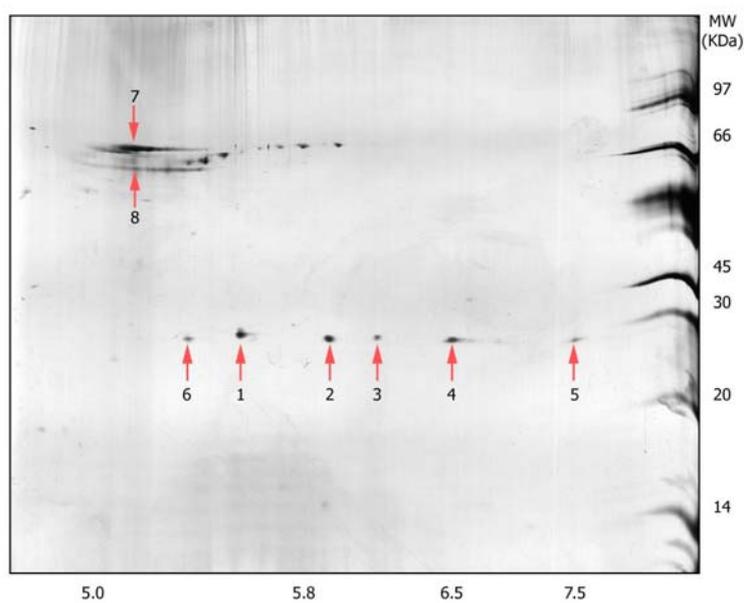


Figura 12 - Eletroforese bidimensional das frações obtidas por cromatografia de afinidade. À direita encontram-se os marcadores de massa molecular (em

kDa), com os respectivos valores. Foi mostrado apenas a faixa de pI onde apareceram os *spots* (4,5 - 8,0). Coloração por Prata.

Os *spots* de massa molecular mais elevada poderiam representar diferentes isoformas da GST, em forma dimérica. No entanto esta possibilidade se torna pouco provável, visto que estas amostras foram tratadas previamente com agentes redutores e desestabilizantes, os quais poderiam, teoricamente, facilmente separar os dímeros em monômeros.

Tabela 5 - Cálculo da massa molecular aparente dos *spots* detectados por eletroforese bidimensional.

padrões (kDa)	migração (cm)	Rf	log10 (kDa)	
97	1,2	0,158	1,987	
66	1,8	0,237	1,820	
45	3,6	0,474	1,653	
30	4,0	0,526	1,477	
20	5,2	0,684	1,301	
14	6,8	0,895	1,146	
<hr/>				
massa molecular aparente calculada (kDa)				amostras
26,09	4,4	0,579	1,417	spots (1-6)
55,15	2,2	0,289	1,742	spot (8)
68,5	1,8	0,237	1,836	spot (7)
<hr/>				
migração corante	7,6	1		

5.5 - Sequenciamento da região N-terminal

No sequenciamento realizado a partir dos *spots* encontrados no gel bi-dimensional, foi obtido apenas a seqüência de 5 resíduos da porção N-terminal das proteínas isoladas. O provável problema encontrado para seguir o sequenciamento foi a concentração das proteínas na membrana, a qual foi considerada baixa para o sequenciamento. Pretende-se aumentar a concentração e otimizar o passo de transferência do gel para a membrana PVDF, a fim de aumentar a concentração das proteínas nos *spots* e viabilizar, desta forma, o sequenciamento de um número maior de resíduos da porção N-terminal das proteínas isoladas.

Tabela 6 - Sequenciamento da porção N-terminal dos *spots* 1, 2, 3 e 4, em seqüenciador Shimadzu (PPSQ-23A).

spot	resíduo				
spot 1	his	arg	gly	trp	his
	h	r	g	w	h
spot 2	pro	ala	tyr	glu	leu
	p	a	y	e	l
spot 3	his	ala	tyr	phe	leu
	h	a	y	f	l
spot 4	pro	ala	tyr	gly	leu
	p	a	y	g	l

O alinhamento destas 4 seqüências de 5 aminoácidos, com seqüências de GSTs depositadas no banco de dados de proteínas SWISS-PROT (*Last major release of the SWISS-PROT protein sequence database (no updates)*) foi realizado por BLAST no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>). A seqüência do *spot* 2 (PAYEL) alinhou com GSTs de *Ratus norvegicus* (rato

marrom) [Glutathione S-transferase alpha - 5](#), *Gallus gallus* (galinha) [Glutathione S-transferase 3 \(GST-CL3\) \(GST class-alpha\)](#) e com *Zea mays* (milho) [Probable glutathione S-transferase BZ2 \(Protein bronze-2\)](#). O spot 4 (PAYGL) alinhou com GSTs de *Ochrobactrum anthropi* (*α*-proteobacteria) [Glutathione S-transferase](#) e *Arabidopsis thaliana* [Glutathione S-transferase PM239X14 \(GST class-Pi\)](#).

Também, foi realizado, o alinhamento das 4 sequências obtidas, utilizando-se o banco de dados “nr” (*All non-redundant GenBank CDS translations+RefSeq Proteins+PDB+SwissProt+PIR+PRF*). No entanto, a utilização deste outro banco de dados resultou no alinhamento com seqüências de GSTs de espécies bastante variadas. As seqüências dos spots 1, 2, 3 e 4 alinharam com 29, 101, 12 e 66 seqüências de GSTs, respectivamente.

7 - Discussão

No presente estudo foram isoladas GSTs de brânquias de ostras *Crassostrea rhizophorae*, utilizando-se cromatografia de afinidade em coluna GSH-agarose. As proteínas isoladas apresentaram atividade de GST-CDNB e GST-ETA, além de massa molecular aparente de acordo com o esperado para GSTs.

A análise da concentração de proteínas das frações eluídas com tampão Tris-GSH na cromatografia de afinidade apresentou algumas dificuldades nos dois métodos utilizados (absorbância em luz U.V. e método de Lowry modificado por Peterson, 1983). Inicialmente as frações eluídas apresentaram uma baixa concentração de proteínas, sendo que em algumas vezes permaneceu abaixo do limite de detecção das metodologias empregadas. Além disso, o tampão de eluição que continha Tris 50 mM e GSH 10 mM pode ter interferido na leitura, principalmente nas dosagens pelo método de Peterson (1983).

Segundo Bollag et al. (1996), o tampão Tris em concentrações acima de 250 μ M e o tripeptídeo GSH em concentrações acima de 100 μ M podem interferir nas reações (Peterson, 1983). Para evitar este problema, as amostras foram precipitadas com acetona. Desta forma, a concentração de proteínas nas frações eluídas com Tris-GSH foi $0,049 \pm 0,027$ mg/ mL (média \pm desvio padrão), cerca de 5 vezes menor a encontrada por Donhan e colaboradores (2005 a, b) em estudo de purificação de GST realizado com espécies de peixes. No entanto, isto não impossibilitou que as demais análises bioquímicas de caracterização das proteínas isoladas fossem realizadas.

Os valores de atividade específica encontrados em diferentes estudos realizados com GSTs é bastante variável (Gadagbui; James, 2000; Yang et al., 2004; Donhan et al., 2005 a,b; Konish et al., 2005). Como observado na maioria dos estudos de purificação de GSTs (Horau et al., 2002; Donhan et al., 2005 a,b), os maiores valores de atividade específica, nas frações eluídas da coluna de cromatografia de afinidade, foram obtidos quando foi utilizado CDNB como substrato, 14,134 U/ mg de proteína (GST-CDNB) e 7,554 U/ mg de proteína (GST-ETA).

Porém os maiores valores de atividade enzimática observado nos extratos incubados com CDNB e ETA foi semelhante (0,279 e 0,312 U/ mL). A diferença observada em termos de atividade específica entre as duas técnicas de quantificação está relacionada à concentração de proteínas nas frações de cada pico, uma vez que os valores máximos de atividade de GST-CDNB e GST-ETA foram detectados em frações distintas. Estes valores foram bastante próximos, estando na mesma ordem de grandeza.

Resultados semelhantes foram apresentados por Yang e colaboradores (2004), em estudo com GST recombinante de *Mytilus edulis* - meGST-CDNB igual a 5,97 U/ mg proteína e meGST-ETA 15,60 U/ mg proteína e por Konish e colaboradores (2005) pmGSTA1-1 CDNB $9,64 \pm 0,22$ U/ mg proteína pmGSTA2-2 $2,88 \pm 0,02$ U/ mg de proteína em GSTs recombinantes de *Pagrus major*. Outros estudos, com espécies de peixes, demonstraram uma atividade GST-CDNB 4 ou mais vezes maior que a atividade de GST-ETA. Donhan e colaboradores encontraram uma atividade de GST-CDNB 205,26 U/ mg de proteína e GST-ETA

49,2 U/mg (esturjão branco) (Donhan et al., 2005 b); e GST-CDNB 46,10 U/mg e GST-ETA 7,5 U/mg no salmonídeo *Oncorhynchus tshawytscha* (Donhan et al., 2005 a).

A elevada atividade de GST- ETA nas frações eluídas da coluna GSH-agarose, sugere a presença de isoformas da classe *Pi* em *C. rhizophorae*. Trivella et al. (2004) observaram que a GST-ETA foi induzida nas brânquias e na glândula digestiva de ostras *C. rhizophorae* após exposição a esgoto doméstico, sendo esta indução foi cerca de 3 vezes maior nas brânquias. Yang e colaboradores (2004) verificaram uma atividade GST-ETA 3 vezes maior que a atividade GST-CDNB de GST recombinante de *Mytilus edulis* (meGST). Conforme revisado por estes autores, grande parte das isoformas de GST presentes em moluscos bivalves pertencem à classe *Pi*, sendo que apenas uma pequena porção enquadra-se nas classes *Alpha*, *Mu* e *Sigma*.

GSTs de moluscos bivalves, apresentam K_m para CDNB variando de 0,28 - 3,70 mM e K_m para GSH de 0,11 - 4,82 mM (Yang, 2004). Observando-se a Tabela 7, verifica-se que os valores de K_m para CDNB e GSH é bastante variável entre os bivalves, bem como entre as diferentes isoformas de GST de uma espécie em questão (ex.: GST3-3, GST5-5 e GST6-6 de *R. decussatus*).

As enzimas isoladas neste estudo apresentaram valores de K_m para CDNB igual a 1,38 mM ($\pm 0,51$) e para GSH 0,77 mM ($\pm 0,35$).

O valor de K_m para CDNB, calculado a partir das análises cinéticas das GSTs isoladas de brânquias de ostras *C. rhizophorae*, está de acordo com o encontrado por Konishi e colaboradores (2005), onde o K_m GST-CDNB foi de 1,33

mM para isoformas da classe *Alpha* do peixe *Pagrus major*, e próximo ao encontrado por Horau e colaboradores (2002), onde o K_m GST-CDNB da isoforma GST5-5 de *R. decussatus* foi igual a 1,65 - Tabela 7. Já o valor de K_m para GSH encontrado neste estudo $K_m = 0,78$ pode ser considerado um valor médio dos encontrados para diferentes espécies de bivalves, estando mais próximo ao K_m detectado para a isoforma - GST1 de brânquias de *Mytilus edulis* ($K_m = 0,50$) (Fitzpatrick et al., 1997).

Tabela 7 - Valores de K_m para CDNB e GSH em diferentes espécies de moluscos bivalves (adaptado de Yang, 2004).

Espécie	GST	K_m CDNB	K_m GSH	Referência
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	GST brânquia	1,38	0,77	este estudo
<i>Mytilus edulis</i>	meGST	0,68	0,06	Yang et al., 2004
<i>Asaphis dichotoma</i>	adGST	0,68	0,11	Yang et al., 2002
<i>Atactodea striata</i>	asGST5-5	0,43	0,19	Yang et al., 2002
<i>Callinectes sapidus</i>	GST1	0,28	0,40	Keeran & Lee, 1987
<i>Callinectes sapidus</i>	GST2	0,31	0,43	Keeran & Lee, 1987
<i>Corbicula fluminea</i>	GST brânquia	0,59	0,46	Vidal & Narbonne, 2000
<i>Mercenaria mercenaria</i>	GSTQ3	0,40	nd	Blanchette & Singh, 2002
<i>Mytilus edulis</i>	GST1 brânquia	3,70	0,50	Fitzpatrick et al., 1995
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GST	0,70	nd	Kaaya et al., 1999
<i>Perna perna</i>	GST	0,41	nd	Kaaya et al., 1999
<i>Ruditapes decussatus</i>	GST3-3	0,17	4,82	Horau et al., 2002
<i>Ruditapes decussatus</i>	GST5-5	1,65	0,37	Horau et al., 2002
<i>Ruditapes decussatus</i>	GST6-6	2,88	1,75	Horau et al., 2002

Muitos estudos vem sendo realizados com GSTs de vertebrados, principalmente mamíferos, e, em menor escala, com GSTs de invertebrados. Na revisão de Clark (1989) pode-se verificar que não existem grandes diferenças entre as GSTs destes dois grandes grupos de animais, exceto algumas exceções. A maioria das espécies estudadas até o momento apresentam mais de uma isoforma de GST, sendo que o padrão de isoformas pode variar bastante nos

diferentes tecidos, como indicado pelo padrão de isoeletrofocalização (revisado por Jakoby, 1978; Mannervik e Danielson, 1988; Beckett; Hayes, 1993).

As GSTs de invertebrados, em forma dimérica apresentam, em média, massa molecular de $43,0 \pm 8$ KDa, e as subunidades $24,9 \pm 3$ KDa, sendo este valor variável dependendo da espécie que está sendo analisada (Clark, 1989).

No presente estudo, as proteínas isoladas por cromatografia de afinidade apresentaram massa molecular aparente igual a 26,09 KDa, calculada a partir das análises de eletroforese 2D. Este valor está de acordo com o previsto para subunidades de GSTs. As análises de isoeletrofocalização, das GSTs isoladas de brânquias de ostras *C. rhizophorae*, mostraram a existência de 6 *spots* diferentes, representando, possivelmente, diferentes subunidades de GSTs que podem ser monômeros de diferentes isoformas. Os valores de pI revelados por isoeletrofocalização variaram de 5,4 a 7,6.

Pham; Barber; Gallagher (2004) isolaram uma isoforma da classe *Alpha*, a qual é codificada pelo gene *GSTA* e representa cerca de 80 % das GSTs encontradas em fígado de *Micropterus salmoides*. Esta isoforma apresentou massa molecular igual a 26,40 KDa, detectada por análises de HPLC, resultado muito semelhante ao encontrado neste estudo. Gadagbui e James (2000) isolaram GSTs de intestino de *catfish* que apresentaram massa molecular igual a 26,7 KDa e pI variando de 8,0-8,2. A isoforma de pI 8,2 foi identificada como pertencente à classe *Pi*, através de comparação da porção N-terminal, e apresentou bastante similaridade com GSTs *Pi* de salmonídeos (63-70% de homologia e 80% de identidade).

GSTs de moluscos bivalves também já foram isoladas. Blanchette e Singh (1999) isolaram quatro subunidades de GST do vôngole *Mercenaria mercenaria*, com massa molecular calculada para 22, 24, 25, and 27 kDa e pI = 5.1, 4.9 e 4.6. Segundo estes autores, o valor ácido dos pI obtidos indicam que as GSTs isoladas pertencem à classe *Pi*.

No entanto, o enquadramento das subunidades nas diferentes classes de isoformas através do pI é contraditório. Gadagbui e James (2000) classificaram subunidades de pI 8,0-8,2 como pertencentes à classe *Pi*, devido à comparação da seqüência de aminoácidos com outras isoformas descritas. Já Blanchette e Singh (1999) sugerem que isoformas de pI ácido podem ser classificadas como da classe *Pi*. Estas contradições da literatura postulam que vários parâmetros devem ser considerados para uma correta classificação da isoforma de GST (Sheehan et al., 2001; Clark, 1989).

O sequenciamento da região N-terminal de GSTs isoladas é uma metodologia utilizada para a classificação das isoformas nas diferentes subfamílias de GST. No entanto, no presente estudo não foi possível a obtenção de informações precisas sobre a composição de aminoácidos das enzimas isoladas, devido aos problemas encontrados no sequenciamento, conforme comentado anteriormente. Atualmente, encontra-se disponível outra técnica para a obtenção da porção N-terminal de proteínas, além das metodologias baseadas na reação de degradação de Edman. Esta nova metodologia consiste na adaptação de técnicas de espectrometria de massa que requerem pequena concentração de proteínas e pouco tempo de execução. No entanto os equipamentos necessários para estas análises não são disponíveis em nossa instituição.

Duas tentativas serão realizadas com o intuito de obter o sequenciamento de uma quantidade maior de aminoácidos da porção N-terminal das proteínas isoladas de brânquias de *C. rhizophorae*. Primeiramente, as análises de eletroforese 2D serão realizadas com uma concentração maior de proteínas. Posteriormente, serão realizadas tentativas de otimização da transferência das proteínas do gel 2D para a membrana de PVDF para garantir uma elevada concentração de proteínas ($\pm 1 \mu\text{g/spot}$).

Se estas tentativas falharem, será tentada a realização de uma parceria com outros pesquisadores para o sequenciamento das isoformas através de espectrometria de massa.

8 - Referências

- ALVES, C.S.; KUHNERT, D.C.; SAVED, Y.; DIRR, H.W. The intersubunit lock-and-key motif in human glutathione transferase A1-1: role of the key residues Met51 and Phe52 in function and dimer stability. *Biochem. J.*, **15**(393-Pt 2):523-528, 2006.
- ALVES, S. R. C.; SEVERINO, P. C.; IBBOTSON, D. P.; SILVA, A. Z.; LOPES, F. R. A. S.; SÁENZ, L. A.; BAINY, A.C. D. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* Mar. *Envir.Res.*,**54**(3-5):241-245, 2002.
- AMARAL, M.C.R., REBELO, M.F.; TORRES, J.P.M.; PFEIFFER, W.C. Bioaccumulation and depuration of Zn and Cd in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828) transplanted to and from a contaminated tropical coastal lagoon. *Mar.Envir. Res.*, **59**(4):277-285,2005.
- BAINY, A.C.D. **Assimilação de cádmio e chumbo no sangue e tecidos de *Pimelodus maculatus* (PISCES, PIMELODIDAE) e seus efeitos sobre a σ -Aminolevulinato desidratase (E.C.:4.2.1.24) eritrocitária.** Porto Alegre/RS: URGs, 1990. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990.
- BARD, S.M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, **40**: 357-389, 2000.
- BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados.** 6ª edição. Tradução de Paulo Marcos Oliveira, Roca, São Paulo, 1996, 1013 pp.
- BECKETT GJ, HAYES JD. Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Adv. Clin. Chem.* **30**:281-380, 1993.
- BEUTLER, T.M.; EATON, D.L. Glutathione S-transferases - amino acid sequence comparación, classification and phylogenetic relationship. *Envir.Carcinogen. Ecotoxicol. Rev.*, **C10**: 181-203, 1992.
- BLAISE, C; SERGY, G.; WELLS, P.G. BERMINGHAM, N.; VAN COILLIE, R. Biological testing - development protection laboratories. *Toxic. Asses. Int. J.*, **3**: 385-406, 1998.
- BLANCHETTE, B.N.; SINGH, B.R. Induction of glutathione-S-transferase in the Northern quahog *Mercenaria mercenaria* after exposure to the polychlorinated biphenyl (PCB) mixture Aroclor 1248. *J Protein Chem.* **21**(8):489-94, 2002.
- BLANCHETTE, B.N.; SINGH, B.R. Purification and Characterization of the Glutathione-S-transferases from the Northern Quahog *Mercinaria mercinaria*. *Mar Biotechnol (NY)*,**1**(1):74-80, 1999.
- BLUM, H; BEIER, H. Gross HJ Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99, 1987.

BOARD, P.G.; BAKER, R.T., CHELVANAYAGAM, G.; JERMIIN, L.S. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.*, **328**: 929–935, 1997.

BOFFI, A.V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo: FAPESP-HUCITEC, 1979.

BOLLAG, D.M.; ROZYCKI, M.D.; EDELSTEIN, S.J. **Protein Methods**. Second Edition. Wiley-Liss, John Wiley & Sons, Inc., Publication, 1996, 415 pp.

BOYLAND, E.; SPEYER, B. E. Enzyme-catalysed reactions between some 2-substituted 5-nitrofurans and glutathione. *Biochem J.*, **119**(3):463-72, 1970.

BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L. F. Glutathione S-alkyltransferase. *Biochem J.* **115**(5):985-91, 1969.

BURGEOT, T., BOCQUÉNÉ, G., PORTE, C., DIMEET, J., SANTELLA, R.M., GARCIA de la PARRA, L.M., PFHOL-LESZKOWICZ, A., RAOUX, C.; GALGANI, F. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **1**: 125-141, 1996.

CANOVA, S.; DEGAN, P.; PETERS L. D.; LIVINGSTONE D. R.; VOLTAN R.; VENIER, P. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.*, **399**(1):17-30, 1998.

CHASSEAUD, L. F. Distribution of enzymes that catalyse reactions of glutathione with alpha beta-unsaturated compounds. *Biochem J.* **131**(4):765-9, 1973.

CLARK, G.A. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B** (3): 419-446, 1989.

CODREANU, S.G.; THOMPSON, L.C.; HACHEY, D.L.; DIRR, H.W.; ARMSTRONG, R.N. Influence of the Dimer Interface on Glutathione Transferase Structure and Dynamics Revealed by Amide H/D Exchange Mass Spectrometry. *Biochem.*, **44**(31): 10605 – 10612, 2005.

DI GIULIO, R. T.; HABIG, C.; GALLAGHER, E. P. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.*, **26**(1-2):1-22, 1993.

DONHAM, R. T.; MORIN, D.; JEWELL W. T.; BURNS, S. A.; MITCHELL, A. E.; LAME M. W.; SEGALL, H. J.; TJEERDEMA, R. S. Characterization of glutathione S-transferases in juvenile white sturgeon. *Aquat. Toxicol.*, **71**(3):203-14, 2005 (b).

DONHAM, R. T.; MORIN, D.; JEWELL, W. T.; LAME, M. W.; SEGALL, H. J.; TJEERDEMA, R. S. Characterization of cytosolic glutathione S-transferases in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquat Toxicol.* **73**(3):221-9, 2005 (a).

DOYEN, P.; VASSEUR, P. RODIUS, F. cDNA cloning and expression pattern of pi-class glutathione S-transferase in freshwater bivalves *Unio tumidus* and *Corbicula fluminea*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **140**(3-4):300-8, 2005.

FATMA - FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE (2005)

- disponível em http://www.fatma.sc.gov.br/servico/2005_monitoramento.htm

- consultado em janeiro de 2006

FIANDER, H.; SCHNEIDER, H. Compounds that induce isoforms of Glutathione S-transferase with properties as a critical enzyme in defense against oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **292**: 591-595, 1999.

FITZPATRICK, P.J.; KRAG, T.O.; HOJRUP, P.; SHEEHAN, D. Characterization of a Glutathione S-transferase and related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biochem. J.*, **305**: 145-150, 1995.

FITZPATRICK, P.J.; O'HALLORAN, J.; SHEEHAN, D.; WALSH, A.R. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gills and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as a potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, **2**: 51-56, 1997.

FRANCO, J.; TRIVELLA, D. B. B.; TREVISAN, R. DINSLAKEN, D.F.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D.; DAFRE, A.L. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to Zinc. *Chem. Biol. Inter.*, **160**(3): 232-240, 2006.

GADAGBUI, B.K.M.; JAMES, M.O. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquat. Toxicol.*, **49**: 27-37, 2000.

GEORGE, S.; BUCHANAN, G. B.; NIMMO, I.; HAYES, J. fish and mammalian liver cytosolic glutathione s-transferases: substrate specificities and immunological comparison. *Mar. Envir. Res.*, **28**(1-4):41-46, 1989.

GOWLAND, B.T.G.; MOFFAT, C.F.; STAGG, R.M.; HOULIHAN, D.F.; DAVIES, I.M. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maena*. *Mar. Environ. Res.*, **54**: 169-177, 2002.

HABIG, W.H.; JAKOBOY, W.B. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase. *Meth. Enzym.*, **77**: 398-405. 1981.

HODGSON, E.; LEVY, P.E. **Introduction to biochemical toxicology**. 2ª edição, Appleton & Lange, Connecticut, U.S.A. p. 75-111, 1994.

HORAU, P.; GARELLO, G.; GNASSIA-BARELLI, M.; ROMEO, M.; GIRARD, J. P. Purification and partial characterization of seven glutathione S-transferase isoforms from the clam *Ruditapes decussatus*. *Eur J Biochem.*, **269**(17): 4359-66, 2002.

HORAU, P.; GARELLO, G.; GNASSIA-BARELLI, M.; ROMÉO, M.; GIRARD, J.P. Effect of three xenobiotic compounds on Glutathione S-transferase in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Toxicol.*, **68**: 87-94, 2004.

IOWA STATE UNIVERSITY OF BIOTECHNOLOGY (2004)

- disponível em <http://www.biotech.iastate.edu/facilities/protein/nsequence494.html>

- consultado em janeiro de 2006

JAKOBY, W.B. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **46**:383-414, 1978.

JAMES, M.O.; BOWEN, E.R.; DANSETTE, P.M.; BEND, J. R. Epoxide hydratase and glutathione S-transferase activities with selected alkene and arene oxides in several marine species. *Chem. Biol. Interact.*, **25**: 321-344, 1979.

KAAYA, A.; NAJIMI, S.; RIBERA, D.; NARBONNE, J. F.; MOUKRIM, A. Characterization of glutathione S-transferases (GST) activities in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* used as a biomarker of pollution in the Agadir marine bay (South of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **62**(5):623-9, 1999.

KEEN, J. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione Transferases - catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J. Biol. Chem.*, **253**(16): 5654-5657, 1978.

KEERAN, W. S.; LEE, R. F. The purification and characterization of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **255**(2): 233-43, 1987.

KONISHI, T.; KATO, K.; ARAKI, T.; SHIRAKI, K.; TAKAGI, M.; TAMARU, Y. Molecular cloning and characterization of α -class glutathione S-transferase genes from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, **140** (3-4): 309-320, 2005.

LE PENNEC, G.; LE PENNEC, M. Induction of glutathione S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L): application for a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquat. Toxicol.*, **64**: 131-142, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 pp.

LIVINGSTONE, D.R. Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **46**: 37-43, 1988.

LO BELLO, M.; NUCCETELLI, M.; CHIESSI, E.; LAHM, A.; MAZZETTI, A.P.; BATTISTONI, A.; CACCURI, A.M.; OAKLEY, A.J.; PARKER, M.W.; TRAMONTANO, A.; FEDERICI, G.; RICCI, G. Mutations of Gly to Ala in human glutathione transferase P1-1 affect helix 2 (G-site) and induce positive cooperativity in the binding of glutathione. *J Mol Biol.*, **284**(5):1717-25, 1998.

LOPES, R.A.S.F. **Análise temporal da resposta de biomarcadores bioquímicos e do nível de metais traços na ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* cultivadas no complexo estuarino de Laguna/SC**. Santa Catarina: UFSC, 2002. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

MANNERVIK, B.; DANIELSON, U. H. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **23**(3): 283-337, 1988.

MANNERVIK, B.; JEMTH, P. Measurement of Glutathione Transferases. *In Current Protocols in Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc. 6.4.1-6.4.10, 1999.

MEYER, D.J.; COLES, B.; PEMBLE, S.E.; GILMORE, K.S.; FRASER, G.M.; KETTERER, B. Theta, a new class of glutathione S-transferase purified from rat and man. *Biochem J.*, **274**: 409-414, 1991.

MICALONI, C.; GEOFFREY, K.W.; MAZZETTI, A.P.; NUCCETELLI, M.; ANTONINI, G.; STELLA, L.; MCKINSTRY, W.J.; POLEKHINA, G.; ROSSJOHN, J.; FEDERICI, G.; RICCI, G.; PARKER, M.W.; LO BELLO, M. Engineering a New C-terminal Tail in the H site of Human Glutathione Transferase P1-1: Structural and Functional Consequences. *J. Mol. Biol.*, **325**: 111-122, 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – **Macrodiagnóstico da zona costeira do Brasil na Escala da União**. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, 1996.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2004)

- disponível em <http://www.mma.gov.br>

- consultado em agosto de 2005

MOTOYAMA, Y. Studies of human liver bilirubin-glycosyl transferase. Bilirubin UDP-xylosyl and UDP-glucuronyl transferase activities in diseased human livers. *Enzyme*, **24**(3):158-62, 1979.

NASCIMENTO, A.; SMITH, D.H.; PEREIRA, S.A.; SAMPAIO DE ARAÚJO, M.M.; SILVA, M.A.; MARIANE, A.M. Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and no impacted by the petroleum industry. *Aquatic Ecos. Hlth. Manag.*, **3**: 449-458, 2000.

NASCIMENTO, I.A.; LEITE, M.B.N.; SANSONE, G.; PEREIRA, S.A.; SMITH, D.H. Stress protein accumulation as an indicator of impact by the petroleum industry in Todos os Santos Bay, Brazil. *Aquat. Ecos. Health Manag.*, **1**:101-108, 1998.

NASCIMENTO, I.A.; LUNETTA, J.E. Ciclo sexual da ostra do mangue e sua importância para o cultivo. *Bol. Fisiol.*, **2**: 63-69, 1978.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION

- disponível em <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>

- consultado em janeiro de 2006

NESTERENKO, M. V.; TILLEY, M.; UPTON, S. J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **28**(3):239-242, 1994.

NOAA (NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION) **Technical Memorandum International Mussel Watch. Initial Implementation. Final Phase Report**. Maryland U.S.A, 63 p. 1995.

OAKLEY, A.J.; LO BELLO, M.; BATTISTINI, A.; RICCI, G.; ROSSJOHN, J.; VILLAR, O.H.; PARKER, M.W. The Structures of Human Glutathione Transferase P1-1 in Complex with Glutathiones and Various Inhibitors at High Resolution. *J. Mol. Biol.*, **274**: 84-100, 1997 (a).

OAKLEY, A.J.; LO BELLO, M.; MAZZETTI, A.P.; FEDERICI, G.; PARKER, M.W. The glutathione conjugate of ethacrinic acid bind to human pi class glutathione transferase P1-1 in two different modes. *FEBS Let.*, **419**: 32-36, 1997 (b).

OAKLEY, A.J.; LO BELLO, M.; NUCCETELLI, M.; MAZZETTI, A.P.; PARKER, M.W. The Ligandin (Non-substrate) Binding Site of Human Pi Class Glutathione Transferase is Located in the ElectroPile Binding Site (H-site). *J. Mol. Biol.*, **291**: 913-926, 1999.

PELLERIN-MASSICOTE, J. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J. Aquat. Eco. Hlth.*, **3**: 101-111, 1994.

PELLERIN-MASSICOTTE, J.; MARTINEU, P.; DESROSIERS, G.; CARON AND, A.; SCAPS, P. Seasonal variability in biochemical composition of the polychaete *Nereis virens* (Sars) in two tidal flats with different geographic orientations. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.*, **107**(3): 509-516, 1994.

PEMPLE, S.E.; TAYLOR, J.B. An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class theta glutathione transferase cDNA. *Biochem. J.*, **287**: 957-963, 1992.

PEREZ-LOPEZ, M.; NOVOA-VALINAS, M.C.; MELGARIOR, M. J. a Glutathione S-transferases cytosolics isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Archlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. *Toxicol. Let.*, **136**: 97-106, 2002 (b).

PEREZ-LOPEZ, M.; NOVOA-VALINAS, M.C.; MELGAR-RIOL, M.J. Induction of cytosolic glutathione S-transferase from Atlantic eel (*Anguilla anguilla*) after peritoneal treatment with polychlorinated biphenyls. *Scien. Tot. Environ.*, **297**: 141-151, 2002 (a).

PETERSON, G.L. Determination of Total Protein. *Meth. Enzymol.*, **91**: 95:119, 1983.

PEW OCEANS COMMISSION **Marine Pollution in the United States**. Arlington, Virginia, 2001.

PHAM, R.T.; BARBER, D.S.; GALLAGHER, E.R. GSTA is a major glutathione S-transferase gene responsible for 4-hydroxynonenal conjugation in largemouth bass liver. *Mar. Envir. Res.*, **58**: 485-488, 2004.

PHILLIPS, D.J.H. Use of bioindicators in monitoring conservative contaminants.:program design imperative. *Mar. Pollut. Bull.*, **17**: 10-17, 1986.

PLYMOUTH MARINE LABORATORY (2006);

- disponível em www.pml.ac.uk/pml/beep.htm

- consultado em fevereiro de 2006

POLLA, B.S.; COSSARIZZA, A. Stress proteins in inflammation. *In Stress-inducibile cell response*. Ed. Feige, U.; Morimpio, R.I., Yanara, I.; Polla, B. Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland, 1996.

RAND G. M. (Ed.) **Fundamentals of aquatic toxicology (Effects, environmental fate, and risk assessment)**. Taylor & Francis , Washington, U.S.A., 1995, 1125 pp.

RANSON, N. A. ; WHITE, H. E.; SAIBIL, H. R. Chaperonins. *Biochem. J.*, **333** (Pt 2):233-42,1998.

REBELO, M. F.; PFEIFFER, W; C.; SILVA, H.; MORAES, M. O. Cloning and detection of metallothionein mRNA by RT-PCR in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *Aquat. Toxicol.*,**64**(3):359-362,2003.

RIOS, E.C.; **Seashells of Brazil**. Rio Grande, Fundação Universidade do Rio Grande, 1985.

ROMÉO, M.; HOARAU, P.; GARELLO, G.; GNASSIA-BARELLI, M.; GIRARD, J.P. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Poll.*, **122**(3): 369-378, 2003.

ROUIMI, P.; ANGLADE, P.; DEBRAUWER, L.; TULLIEZ, J. Characterization of pig liver glutathione S-transferases using HPLC–electrospray-ionization mass spectrometry *Biochem. J.*, **317**: 879–884, 1996.

SATOH, K.; KITAHARA, A.; SOMA, Y.; INABA, Y.; HATAYAMA, I.; SATO, K. Purification, Induction, and Distribution of Placental Glutathione Transferase: A New Marker Enzyme for Preneoplastic Cells in the Rat Chemical Hepatocarcinogenesis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)*, **82**: 3964-3968, 1985.

SCHLEIF, R.F.; WENSINK, P.C. **Practical methods in molecular biology**. New York, Springer-Verlag. 74pp., 1981.

SCOPES, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.*, **59**(1): 277-82, 1974.

SHEEHAN, , D.; MEADE, G.; FOLEY, V.M.; DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of a fan enzyme superfamily. *Biochem. J.*, **360**: 1-16, 2001.

SILVA, A.Z.; ZANETTE, J.; FERREIRA, J.F.F.; GUZENSKI, J; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environm. Saf.*, **62**(3): 376-382, 2005.

SILVA, C. A. R.; RAINBOW, P. S.; SMITH; B. D.; SANTOS, Z. L. Biomonitoring of TRACE metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. *Wat. Res.*, **35**(17): 4072-4078, 2001.

SINDERMAN, C. J. **Ocean pollution - effects on living resources an humans**. CRC Press Inc., 1996, 257 pp.

SMITAL, T.; KURELEC, B. The chemosensitizers of multixenobiotic resistente mechanism in aquatic invertebrates: a new class od pollutants. *Mut. Res.*, **399**: 43-53, 1998.

TIMBRELL, J.A. **Introduction to toxicology**. 3ª edição, Taylor & Francis, London, U.K. 2002, 215 pp.

TRIVELLA, D.B.B.; MEDEIROS, I.D.; TOLEDO-SILVA, G.; FERREIRA, J.F.F.; BAINY, A.C.D. Biochemical responses in mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* exposed to domestic sewage. *Sociedade Brasileira de Bioquímica* - Livro de resumos, 2004

VALLES, S.M.; PEREIRA, O.P.; STRONG, C.A. Purification, biochemical characterization, and cDNA cloning of a glutathione S-transferase from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Insect Biochem. Mollet. Biol.*, **33**: 981-988, 2003.

VENTURA, E.C.; GAELZER, L.R.; ZANETTE, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. *Mar. Envir. Res.*, **54**: 775-779, 2002.

VIARENGO, A.; CANESI, L. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*. 94: 225-243, 1991.

WABURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und kristallisation des gaerungsferments enolase. *Biochem. Z.*, **310**: 384-421, 1962 *apud* Bollag et al., 1996 .

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B. **Principles of ecotoxicology**. Taylor & Francis, Londres, 1996, 321 pp.

WALLNER-KERSANACH, M., THEEDE, H., EVERSBERG, U., LOBO, S. Accumulation and elimination of trace metals in a transplanted experiment with *Crassostrea rhizophorae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **8**(1): 40-45, 2000.

WETLAUFER, D.B. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. *Adv. Prot. Chem.*, **17**: 303-390, 1962.

WHITAKER, J.R.; GRANUM, P.E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.*, **109**: 156-159, 1980.

WILL, Y. Overview of Glutathione Function and Metabolism. *In Current Proteocols in Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc. 6,1,1-6,1,18, 1999.

WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, **19**: (2): 137-161, 1991.

YANG, H.; ZENG, Q.; LI, E.; ZHU, E.; ZHOU, X. Molecular cloning, expression and characterization of glutathione S-transferase from *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, **139**(2): 175-182, 2004.

ZANETTE, J.; SILVA, A.Z.; TRIVELLA, D.B.B.; SOLIMAN, L.P.; FREITAS, F.A.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. The influence of salinity on biomarkers of aquatic contamination in mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*) exposed to diesel oil. *Pollutant Responses in Marine Organisms* - Abstract Book. 2003.