

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NOTURNO

Vanessa Schadeck Deconto

**Prevalência das isoformas de Glutathione *S*-transferase em diferentes tecidos de ostras
Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)**

Florianópolis

2019

Vanessa Schadeck Deconto

**Prevalência das isoformas de Glutathione *S*-transferase em diferentes tecidos de ostras
Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)**

Trabalho de conclusão de curso (TCC)
submetido ao Centro de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do grau de Licenciada em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Flávia Lucena Zacchi.

Florianópolis

2019

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

Deconto, Vanessa Schadeck
Prevalência das isoformas de Glutathione S-transferase
em diferentes tecidos de ostras *Crassostrea gigas*
(Thunberg, 1793) / Vanessa Schadeck Deconto ; orientador,
Flávia Lucena Zacchi, 2019.
50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Xenobióticos. 3.
Biomarcadores. 4. Biotransformação. 5. Bivalves. I. Zacchi,
Flávia Lucena. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Vanessa Schadeck Deconto

**Prevalência das isoformas de Glutathione S-transferase em diferentes tecidos de ostras
Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)**

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado para obtenção do título de “Licenciada em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 04 de julho de 2019.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Orientadora: Dra. Flávia Lucena Zacchi
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro titular: Dra. Karim Hahn Lüchmann
Universidade Estadual de Santa Catarina

Membro titular: Dra. Daína Lima
Universidade Federal de Santa Catarina

Agradecimentos

Preciso começar agradecendo a minha família pelo apoio que foi essencial para que eu conseguisse concluir essa missão. Minha diva/mãe, pai e vó obrigada por serem meu chão e por sempre estarem ao meu lado acreditando e confiando no meu potencial.

Obrigada aos meus amigos queridos que fizeram dessa graduação um processo mais leve e prazeroso.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, por tornarem possível a produção deste trabalho.

Aos membros do LABDEF, professor Alcir, doutores Naissa, Danielle, Rafael muito obrigada por terem me acolhido já no meu primeiro semestre de graduação, pela atenção, pelos ensinamentos e pela introdução na área da bioquímica que já acredito ser o meu caminho.

Agradeço as queridas doutoras Juliana, Daína e Karim pela disponibilidade e dedicação em contribuir tão lindamente com este trabalho.

Aos professores Afonso, Guilherme e Risoleta, agradeço infinitamente pelo apoio. Aos labcaianos todos, obrigada pela confiança e por me receberem desde o primeiro dia como se eu já fosse de casa. Clei por dividir a bancada comigo ouvindo boas músicas sempre, Miguelito pela parceria no lab e no bar também, bamos seguir bebendo, Camila pelas ajudas na bancada, mas também pelas nossas conversas e risadas, Barbara pelos ensinamentos bioquímicos, mas também pelas caronas, Isis nossa motorista oficial com destino ao RU (não importa em quantos estamos) e parceira no Witch on Fire, Vera por sempre estar disposta em ajudar, Lígia (essa estrela) pelas muitas risadas, Luiza por trazer tanta fofura pra esse grupo!

Como eu sempre digo, este é o melhor laboratório, com as melhores pessoas, sou muito grata de ter vocês todos na minha vida, melhor curva de rio, todos os dias vocês me fazem chorar, mas é sempre de tanto rir! Posso dizer sem medo, eu amo todos vocês.

Luiz, agradeço pela tua disposição, parceria e amizade, tu sempre foste a minha referência durante essa graduação, obrigada pelas colheitas de pitanga e muitas térmicas de café delicioso que nos fazem não parar mais de falar.

Ao dono da sala 93, que me engrandece tanto na bioquímica como espiritualmente, melhor técnico de laboratório, biólogo e amigo querido, Jacó não tenho nem palavras, se não fosse por todas as tuas dicas, suporte, proatividade, dedicação e claro muitas risadas, bons vídeos e músicas, com certeza, esse trabalho não teria saído, obrigada!

Por último e mais importante à minha orientadora ♥ Flávia Lucena Zacchi ♥ te agradeço muito por ter acreditado tanto em mim, por sempre dividir teu vasto conhecimento comigo, pela amizade, companheirismo, cumplicidade, pelas conversas, risadas e conselhos, muito obrigada! Hoje não consigo imaginar a minha vida sem tua parceria <3.

RESUMO

As Glutathione S-Transferases (GST) são uma família de enzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos com a glutathione reduzida (GSH), e participam do processo de biotransformação de fase II. Essas enzimas são conservadas e podem ser encontradas em diversos grupos de organismos vivos. As isoformas de GST podem ser utilizadas como biomarcadoras de contaminação aquática em estudos ecotoxicológicos envolvendo invertebrados marinhos, como no caso da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*, espécie comumente utilizada em estudos moleculares com moluscos bivalves. Utilizando como referência estudos prévios que realizaram uma curadoria manual para a identificação, classificação e caracterização das isoformas de GST, foram realizadas análises de PCR em tempo real (qPCR) com a finalidade de avaliar a prevalência das isoformas da família de GST nos tecidos de: manto, brânquias, palpos labiais, músculo adutor, glândula digestiva e coração, de *C. gigas*. De 25 isoformas identificadas, foi possível desenhar iniciadores específicos para 19 sequências. Os resultados mostram uma visão geral da transcrição gênica da família das GST e sugere a atuação no metabolismo de compostos endógenos e exógenos em diferentes tecidos de *Crassostrea gigas*. Destaca-se a atuação das GST em glândulas digestivas, uma vez que sete isoformas mostraram prevalência nos níveis de transcritos basais comparado a outros tecidos. A partir de comparações com outros estudos, bem como da correlação com as funções descritas para outros animais, esse estudo pode auxiliar na escolha de um tecido das ostras para estudos com biomarcadores de contaminação aquática ou de metabolismo endógeno e reforça as classificações e nomenclaturas da família das GST em *C. gigas*, realizadas por nosso grupo de pesquisa.

Palavras-chave: Xenobióticos; Biomarcadores; Biotransformação; Bivalves.

ABSTRACT

The Glutathione *S*-Transferases (GST) are a family of enzymes that catalyzed the conjugation of electrophilic compounds with reduced glutathione (GSH), and participate in the process of xenobiotics biotransformation. These enzymes are well preserved and can be found in many living groups. The GST isoforms can be used as biomarkers of aquatic contamination in ecotoxicological studies involving marine invertebrates, as in the case of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, a species commonly used in molecular studies with bivalve molluscs. The *C. gigas* oyster genome was recently sequenced, but the automated annotation generated inconsistencies in the identification of the genes. Using as a reference studies that conducted a manual curation for the identification of GST isoforms, Real Time PCR (qPCR) analyses were performed with the purpose of evaluating the prevalence of GST family isoforms in mantle, gills, labial palps, adductor muscle, digestive gland and heart of *C. gigas*. From 25 identified isoforms, it was possible to make specific primers for 19 sequences. The results show an overview of the gene transcription of the GST family and suggests the participation in the metabolism of endogenous and exogenous compounds in different tissues of *Crassostrea gigas*. It is emphasized the performance of GST in digestive glands, since seven isoforms showed prevalence in the levels of basal transcripts compared to other tissues. Based on comparisons with other studies, as well as the correlation with the functions described for other animals, this study may assist in the selection of oyster tissue for studies with biomarkers of aquatic contamination or endogenous metabolism in oysters and reinforces the classifications and nomenclatures of the GST family in *C. gigas*, conducted by our research group.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 DESENHO DOS INICIADORES (PRIMERS)	18
3.2 OBTENÇÃO DOS TECIDOS, EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA	18
3.3 ANÁLISE DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA EM DIFERENTES TECIDOS DE <i>C. gigas</i>	19
3.4 ESTATÍSTICA DE DADOS	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 INICIADORES	21
4.2 ANÁLISES DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE ISOFORMAS DE GST	24
4.2.1 GST KAPPA	25
4.2.2 GST ÔMEGA	26
4.2.3 GST SIGMA	28
4.2.4 GST TETA	30
4.2.5 GST RHO - LIKE	31
4.2.6 GST MI	33
4.2.7 GST PI	34
4.2.8 GST ALFA	36
4.2.9 GSTS MICROSSOMAIS	37
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	39
6. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

As regiões geográficas de maior concentração da população são as zonas costeiras, principalmente por possuírem acesso ao transporte e comércio marítimo, atividades recreativas, oportunidades econômicas, disponibilidade de recursos naturais e potencial turístico (NEUMANN et al., 2015). Por exemplo, megacidades (acima de 10 milhões habitantes) quando situadas nas regiões costeiras, podem gerar pressões antrópicas sobre esses sistemas aquáticos. Como consequência, os ambientes costeiros e estuarinos tornam-se receptores de contaminantes e poluentes (SEKOVSKI; NEWTON; DENNISON, 2012). Em 2008, Halpern e colaboradores realizaram um mapa global do impacto humano nos ecossistemas marinhos e indicaram que não há áreas livres da influência dos seres humanos e a costa brasileira ficou classificada como área de médio e alto impacto. Já em um novo estudo realizado em 2013, cinco anos depois, mostrou que quase 66% do oceano e 77% das jurisdições nacionais mostram um aumento do impacto humano, impulsionado pelas pressões da mudança climática. Nas regiões do Atlântico subtropical mostraram escores de impacto aumentados em relação ao primeiro trabalho (HALPERN, 2015).

Com esses estudos, percebe-se que a contaminação aquática em regiões costeiras ainda é recorrente. No Estado de Santa Catarina é possível constatar a ação humana sobre esses sistemas aquáticos. Uma notícia publicada pela CASAN (Companhia Catarinense de Água e Saneamento) no ano de 2018, anunciou a ampliação da cobertura da coleta de esgoto da cidade de Florianópolis de 56% para 74%, até 2019. Sendo assim, atualmente, praticamente metade do esgoto da cidade de Florianópolis ainda não é coletado para tratamento pela companhia responsável. Ainda, segundo os relatórios de balneabilidade das praias de Florianópolis, disponibilizados no *site* do Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina - IMA, 64 pontos estavam próprios e 22 pontos estavam impróprios para banho nas primeiras semanas de janeiro de 2019. Essas notícias demonstram, portanto, que a contaminação aquática no Brasil, em SC e em Florianópolis, ainda é um problema atual e recorrente.

Os ambientes aquáticos podem se tornar receptores finais de diversos contaminantes oriundo de ações antrópicas e o monitoramento da qualidade desses locais pode ser realizado através da análise das respostas à exposição e dos efeitos biológicos desses compostos em alguns organismos aquáticos (RODRÍGUEZ-ORTEGA et al., 2002). A análise de alterações de processos bioquímicos, fisiológicos, tissulares e moleculares em função da exposição às

substâncias químicas exógenas aos organismos, os xenobióticos, são uma ferramenta para a avaliação dos seus potenciais riscos. Essas alterações indicam exposição ou efeito nos animais a esses agentes estressores e são chamadas de biomarcadores (BELIAEFF; BURGEOT, 2002; HUGGETT et al., 1992). Esses animais, com destaque para os peixes e os moluscos, podem ser utilizados como organismos bioindicadores, e permitem a avaliação da qualidade do ambiente e como ele muda com o tempo (HOLT, 2010; PIAZZA, 2016). Moluscos bivalves, como ostras e mexilhões, são organismos bioindicadores de contaminação de ambientes aquáticos comumente escolhidos, uma vez que são animais filtradores, sésseis e possuem ampla distribuição geográfica (RODRÍGUEZ-ORTEGA et al., 2002; ZACCHI, 2017; ZHANG et al., 2012).

A ostra da espécie *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), conhecida também como ostra do Pacífico, é o molusco bivalve mais cultivado e consumido no mundo (NUNES, 2013). De origem japonesa, onde tem sido cultivada há décadas, *C. gigas* foi introduzida de forma generalizada em diversos outros países. Chegou ao Brasil por volta dos anos 70, e passou a ser cultivada na década de 80, no Estado de Santa Catarina (FAO, 2019; FERREIRA; NETO, 2007). Santa Catarina é responsável por mais de 90% da produção nacional de ostras, onde suas larvas (ou sementes) são produzidas e distribuídas pelo Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, que desde 1988, é o principal indutor da atividade no Estado (ACEB, 2014). A comercialização de ostras *C. gigas* na safra de 2017 foi de 2.529 toneladas e, apenas a cidade de Florianópolis foi responsável por uma produção de 1.778 toneladas (EPAGRI, 2017). Além de seu valor comercial, é considerada um animal modelo em estudos que avaliam os ambientes aquáticos (NUNES, 2013). A ostra *C. gigas* é amplamente usada em estudos com biomarcadores de efeitos ecotoxicológicos e de exposição a contaminantes. Esses estudos com *C. gigas* foram recentemente facilitados e suportados pelo sequenciamento e publicação do seu genoma por Zhang et al., (2012a).

Em estudos ecotoxicológicos com moluscos são comumente escolhidos os tecidos das brânquias e glândulas principalmente em trabalhos com exposição a contaminantes como observado em Lüchmann et al. (2014) mostrando diferença de transcrição entre os tecidos. Porém acredita-se que outros tecidos tenham o potencial para serem usados nesses estudos com exposição ou até mesmo com o metabolismo endógeno em moluscos (GERDOL et al., 2017).

Em bivalves, a transcrição de genes e atividade de enzimas relacionadas ao sistema de biotransformação, participam da metabolização de diversos contaminantes ambientais, auxiliando no processo de eliminação desses compostos (SACCO, 2006). Os perfis de transcrição gênica estão nos primeiros níveis de resposta a estressores ambientais. O surgimento

de técnicas de biologia molecular na área de ecotoxicologia, possibilitou um melhor entendimento dos mecanismos de ação de contaminantes em diversos organismos aquáticos (BRULLE et al., 2008).

Devido à natureza lipofílica de muitos xenobióticos, esses compostos são difíceis de serem eliminados pelos organismos. Assim, o processo de biotransformação de xenobióticos pode levar à formação de um composto mais hidrofílico para ser excretado do organismo mais facilmente do que o composto inicial (LÜCHMANN, 2012; OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A eliminação de xenobióticos pode estar relacionada à atividade, complemento e indutibilidade de enzimas de biotransformação que podem ser de fase I, II (LIVINGSTONE, 1998). Quando um xenobiótico entra na célula, ele pode ser biotransformado por enzimas de fase I que participam das reações redox, catalisadas principalmente pelo complexo citocromo P450 (CYP450) e flavinas-monooxigenases (FMOs). Essas enzimas introduzem ou expõem grupos funcionais nos xenobióticos por meio de reações de oxidação, redução ou hidrólise. Esses grupos funcionais tornam os xenobióticos mais hidrofílicos e criam neles centros eletrofílicos, facilitando as reações de conjugação (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004a; NIYOGI et al., 2001). Esses metabólitos gerados podem ainda não ser hidrossolúveis o suficiente para serem excretados da célula, então precisam ser conjugados com outras moléculas endógenas. Esse processo pode ser facilitado pelas enzimas de fase II (ZACCHI, 2017).

As enzimas de fase II catalisam a conjugação dos xenobióticos biotransformados pela fase I ou substratos que já possuem centro eletrofílico, com moléculas endógenas, como o ácido glicurônico; sulfato; glutatona reduzida; aminoácidos ou acetato, tornando-as mais solúveis. As glutatona *S*-transferases (GST) são importantes enzimas de biotransformação de fase II (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Essas enzimas catalisam a conjugação de uma ampla gama de xenobióticos com o tripeptídeo endógeno glutatona reduzida (GSH) (SHARMA et al., 2004). O ataque de espécies eletrofílicas é prevenido através da conjugação da glutatona reduzida (GSH) catalisada pelas GSTs que são uma importante barreira antioxidante na prevenção contra os danos causados pelos xenobióticos eletrofílicos (AWASTHI, 2006). Ainda pode acontecer a fase III, quando proteínas de membrana, componentes do sistema de resistência a múltiplos xenobióticos, transportam esses compostos para fora da célula (KEPPLER; RINGWOOD, 2001; LUCKENBACH; EPEL, 2008). Além de biotransformação, as GSTs podem estar envolvidas também na eliminação dos subprodutos de espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenhando um papel como antioxidantes indiretos

(NUNES, 2013; BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004a). As GST podem reagir com vários subprodutos do estresse oxidativo, como os hidroperóxidos lipídicos, por exemplo. Em concentrações fisiológicas, as GST regulam os níveis de EROs, evitando sua proliferação celular, prevenindo o seu acúmulo e protegendo as células contra apoptose (AWASTHI, 2006). Acredita-se que essas enzimas podem ter participação no metabolismo endógeno também, as isoformas de GST Pi, GST Mi e GST Alfa, podem metabolizar a conjugação do 4-hidroxinon-2-enal, um substrato clássico dessas isoformas em mamíferos (ÅLIN; DANIELSON; MANNERVIK, 1985; DANIELSON; ESTERBAUER; MANNERVIK, 1987; SINGHAL et al., 1994).

As GST são uma família de enzimas presentes em todos os principais taxa, incluindo fungos, plantas e animais. Elas podem ser citosólicas, mitocondriais e microssomais, também conhecidas como MAPEG (do inglês *Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*).

Em mamíferos, foram identificadas sete classes de GST citosólicas: Alfa, Mi, Pi, Sigma, Teta, Ômega e Zeta, além de isoformas mitocondriais (Kappa) e microssomais (MAPEG) (PEMBLE; WARDLE; TAYLOR, 1996; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Entretanto, ao contrário do observado para mamíferos, a identificação e o número total de GST em moluscos bivalves ainda é incerto. Boutet, Tanguy e Moraga (2004b) identificaram, clonaram e sequenciaram quatro isoformas de GST em *C. gigas*: Ômega, Pi, Mi e Sigma. Entretanto, estudos realizados no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI/UFSC) observaram diferenças nos níveis de transcrição gênica de outras isoformas putativas de GSTs (*GST microssomal-like* e *GST-like*), avaliadas como potenciais biomarcadores na ostra nativa *Crassostrea gasar* expostas à fração solúvel do óleo diesel e fenantreno (LÜCHMANN et al., 2014; ZACCHI et al., 2017). Acredita-se que haja outras isoformas de GST em *C. gigas* que possam atuar como potenciais biomarcadores de contaminação, além das quatro descritas por Boutet, Tanguy e Moraga (2004b).

Assim sendo, devido à ampla utilização de *C. gigas* em estudos ambientais, foi realizada pelo grupo de pesquisa do LABCAI (UFSC), uma triagem (*screening*) do genoma da ostra *C. gigas*, disponível nos bancos de dados públicos a partir do trabalho de Zhang et al., 2012, seguida de curadoria manual para a identificação e organização das isoformas da família das GST. Essa busca foi realizada a partir dos domínios funcionais (PFAM) da família das GST, e foi possível identificar sequências contendo os domínios C-terminal e N-terminal; MAPEG e DSBA, considerados domínios pertencentes à família das GSTs citosólicas, microssomais e mitocondriais, respectivamente. Com a curadoria manual das sequências de maneira individual,

foi gerado um banco de dados (Tabela 1), com o total de 25 sequências identificadas como diferentes isoformas de GST, que incluem: duas GST microsossomais 1 (*CgMGST1*); uma GST microsossomal 2 (*CgMGST2*); três GST microsossomais 3 (*CgMGST3*); uma GST mitocondrial, identificada como Kappa (*CgGSTK*); e as GST citosólicas: quatro Ômega (*CgGSTO*); uma Sigma (*CgGSTS*); duas Alfa (*CgGSTA*); duas Pi (*CgGSTP*); duas Mi (*CgGSTM*); três Teta (*CgGSTT*); uma Delta-like (*CgGSTD*); e três Rho-like (*CgGSTR*). Para todas as sequências identificadas no genoma e curadas manualmente, foram encontradas respectivas regiões codificantes transcritas (*tophit*) nos bancos de dados de transcritomas de *C. gigas* (dados não publicados de ZACCHI).

Tabela 1 - Regiões codificantes das GST identificadas no genoma e transcritomas de *Crassostrea gigas* a partir de busca por domínios funcionais (PFAM).

	Tamanho (AA)	Domínios PFAM
Microsossomais		
1		
<i>CgMGST1.1</i>	147	MAPEG (PF01124)
<i>CgMSG1.2</i>	152	MAPEG (PF01124)
2		
<i>CgMGST.2</i>	153	MAPEG (PF01124)
3		
<i>CgMGST3.1a</i>	142	MAPEG (PF01124)
<i>CgMGST3.2a</i>	146	MAPEG (PF01124)

<i>CgMGST3.2b</i>	146	MAPEG (PF01124)
Mitochondrial		
<i>CgGSTK</i>	224	DSBA (PF01323)
Citosólicas		
Ômega		
<i>CgGSTO.1</i>	239	GST_N_3 (PF13417) + GSC_C_2 (PF13410)
<i>CgGSTO.2</i>	240	GST_N_3 (PF13417) + GSC_C (PF00043)
<i>CgGSTO.3</i>	239	GST_N_3 (PF13417) + GSC_C_2 (PF13410)
<i>CgGSTO.4a</i>	243	GST_N_3 (PF13417) + GSC_C (PF00043)
Sigma		
<i>CgGSTS.1a</i>	203	GST_N (PF02798) + GSC_C_3 (PF14497)
Alfa		
<i>CgGSTA.1a</i>	225	GST_N (PF02798) + GSC_C_3 (PF14497)
<i>CgGSTA.1b</i>	225	GST_N (PF02798) + GSC_C_3 (PF14497)
Pi		
<i>CgGSTP.1</i>	207	GST_N (PF02798) + GSC_C_3 (PF14497)
<i>CgGSTP.2</i>	207	GST_N (PF02798) + GSC_C_3 (PF14497)

Mi

CgGSTM.1a 215 GST_N (PF02798) + GSC_C_3 (PF14497)

CgGSTM.1b 215 GST_N (PF02798) + GSC_C_3 (PF14497)

Delta-like

CgGSTD.1a 223 GST_N (PF02798) + GSC_C_3 (PF14497)

Teta

CgGSTT.1 230 GST_N_2 (PF13409) + GSC_C (PF00043)

CgGSTT.2a 234 GST_N (PF02798) + GSC_C (PF00043)

CgGSTT.2b 234 GST_N_3 (PF13417) + GSC_C (PF00043)

Rho-like

CgGSTR.1a 227 GST_N (PF02798)

CgGSTR.1b 227 GST_N (PF02798)

CgGSTR.2a 227 GST_N (PF02798)

A partir das sequências de GST de *C. gigas* identificadas, uma árvore filogenética com GST de vertebrados e invertebrados foi inferida (figura 1), e corrobora a classificação e nomenclatura proposta. Observou-se que há um agrupamento das GSTs microssomais com as isoformas microssomais de *Homo sapiens*; *Drosophila melanogaster*; *Danio rerio* e *Lottea gigantea*. O mesmo foi observado para as GST mitocondriais (ou Kappa) e para as GST citosólicas. As GST são membros de uma família de enzimas evolutivamente antiga que

derivaram de uma proteína ancestral, provavelmente mais semelhante às proteínas tiorredoxinas atualmente existentes (AWASTHI, 2006). Sabe-se que evolutivamente houve uma diversificação das GST, e a presença de certas isoformas varia de acordo com as espécies (SHEEHAN et al., 2001).

Baseado nas similaridades entre sequências de aminoácidos, sete isoformas de GST citosólicas são reconhecidas em mamíferos: Alfa, Mi, Pi, Sigma, Teta, Ômega e Zeta (AWASTHI, 2006). Entretanto, outras isoformas de GST, como Beta, Delta, Epsilon, Lambda, Phi, Rho e Tau foram identificadas em organismos não mamíferos, como insetos (KETTERMAN et al., 2001); plantas (WAGNER et al., 2002); bactérias (VUILLEUMIER; PAGNI, 2002); fungos (MOREL et al., 2009), peixes (GILSIC et al., 2015) e bivalves (HOARAU et al., 2002). Dentre as GST específicas de não mamíferos, no estudo anterior realizado no LABCAI encontrou também sequências agrupadas às de *GST Rho* de *Danio rerio* e *GST* não nomeada de *Lottia gigantea*, além de uma sequência agrupada às de *GST Delta* de *Drosophila melanogaster*. Esse agrupamento auxiliou na nomenclatura das GST identificadas em *C. gigas*, mantidas até o presente momento, como *CgGSTRho-like* e *CgGSTDelta-like*.

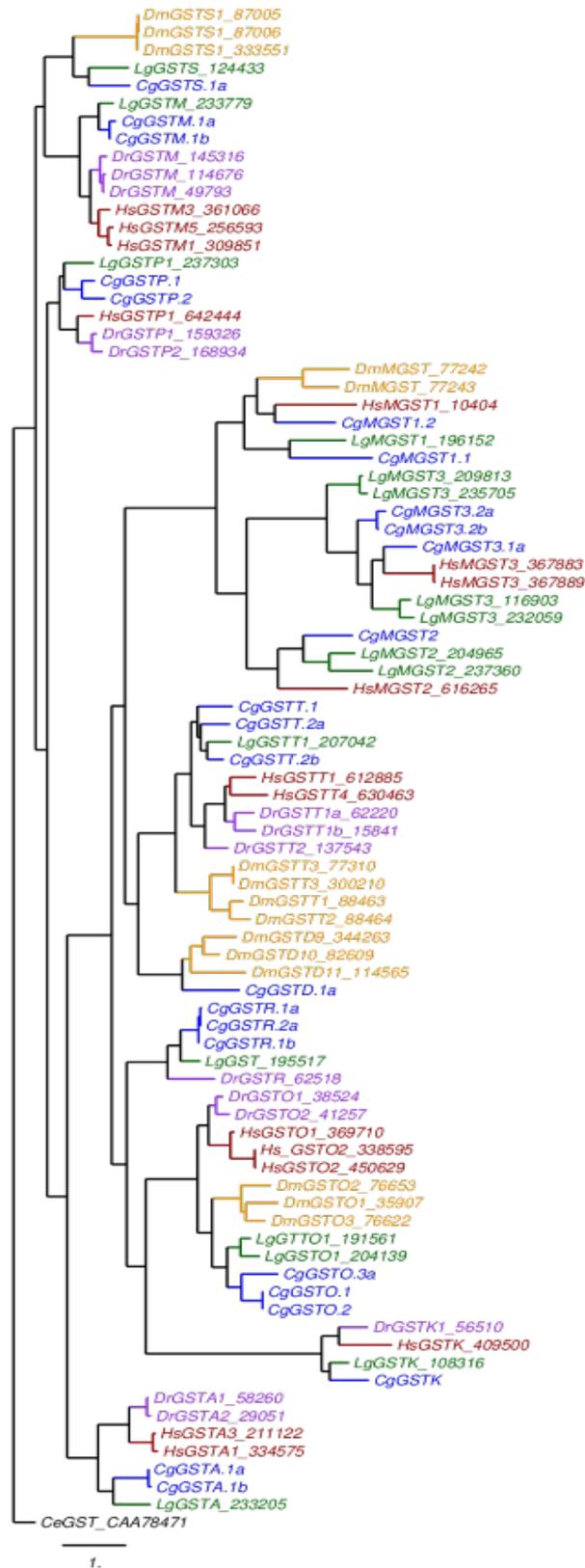


Figura 1. Árvore filogenética PhyML da família das GSTs, incluindo GST citosólicas, microsossomais e mitocondrial de *Crassostrea gigas* (azul), *Lottia gigantea* (verde), *Danio rerio* (roxo), *Drosophila melanogaster* (alaranjado) e *Homo sapiens* (vermelho). GST de *Caenorhabditis elegans* como *outgroup* (Fonte: Dados não publicados de Zacchi et al.)

Essa identificação e organização permitiu agrupar as GST em isoformas e nomeá-las, para serem realizadas posteriormente por este trabalho, as análises de seus níveis de transcritos em diferentes tecidos de *C. gigas*. A quantificação do nível de transcritos de um gene pode ser realizada a partir da quantificação do RNA celular (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) gera cópias a partir de um molde de DNA de forma exponencial, após a transformação do RNA em DNA complementar (cDNA) por meio da transcrição reversa (TR). A PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) é a detecção e quantificação de cópias geradas em cada ciclo da PCR que são proporcionais à quantidade de moldes do início do processo (GINZINGER, 2002). A alta sensibilidade da técnica permite a detecção de pequenas variações das sequências de ácidos nucleicos e também a sua especificidade permite discriminar quantitativamente os alvos moleculares (DOOMS; CHANGO; ABDEL-NOUR, 2014).

Esse estudo reforça as classificações e nomenclaturas da família das GST em *C. gigas*, realizadas por nosso grupo de pesquisa. Além disso, essas análises apontaram os níveis de transcrição das diferentes isoformas de GST e estabeleceram a relação de diferença nos tecidos das ostras *Crassostrea gigas* para cada isoforma identificada. Esses resultados podem auxiliar na escolha de um tecido para futuros trabalhos com biomarcadores de contaminação aquática ou também estudos com metabolismo endógeno desses animais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o nível de transcritos basais das isoformas de genes da família das glutathiona *S*- transferases em diferentes tecidos da ostra *Crassostrea gigas*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar iniciadores específicos para as isoformas previamente identificadas da família das Glutathiona *S*-transferases de ostras *C. gigas*;
- Quantificar o nível de transcritos das isoformas da família das GSTs nos tecidos da brânquia, glândula digestiva, manto, palpos labiais, coração e músculo adutor de ostras *C. gigas* por qPCR;
- Relacionar os resultados observados da transcrição de isoformas de GST nos tecidos de *C. gigas* com funções das isoformas descritas na literatura para outras espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DOS INICIADORES (*PRIMERS*)

O desenho dos *primers* foi realizado a partir das ORFs (Open Reading Frames) já identificadas em estudos anteriores das GSTs de *C. gigas* (Dados de ZACCHI (2019) não publicados. Comunicação oral). Os iniciadores foram desenhados para as vinte e cinco sequências de GST identificadas pelo nosso grupo de pesquisa a partir do genoma da ostra publicado (ZHANG et al., 2012). Para o desenho, foi utilizado o software Primer Quest, disponível em www.idtdna.com (IDT). Foram seguidos os parâmetros: (a) tamanho do primer: mínimo (mín) 18, ótimo (opt) 26 e máximo (máx) 30; (b) temperatura média (T_m) do primer: 55 (mín), 60 (opt), 65 (máx); (c) primer GC%: 45 (mín), 50 (opt), e 55 (máx); (d) tamanho do amplicon: 80 (mín), 110 (opt), 120 (max); aceitando máximo de diferença de T_m de um grau Celsius. Os *primers* também foram avaliados quanto à formação de dímeros e *hairpin*, através do software Oligo Analyzer 3.1 disponível em www.idtdna.com (IDT). Foram considerados os iniciadores com ΔG mínimo de -7 kcal/mol para a formação de dímeros e de até 10 °C abaixo da T_m do iniciador, para a formação de *hairpin* ($\pm 50^\circ\text{C}$).

3.2 OBTENÇÃO DOS TECIDOS, EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

Trinta ostras *Crassostrea gigas* foram adquiridas em comércio local, Verde Mar pescados, da cidade de Florianópolis, ainda vivas, antes de qualquer refrigeração com 6 -7 cm. Foram dissecadas e seus tecidos: manto, brânquias, palpos labiais, músculo adutor, glândula digestiva e coração, (figura 2) foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados em freezer -80 °C. Para as amostras de coração, foram realizados *pools* com os tecidos de três animais, para atingir o peso mínimo necessário, desse pool de três animais, foi escolhido um único animal para ser utilizado para a coleta dos outros tecidos ($n=10$).

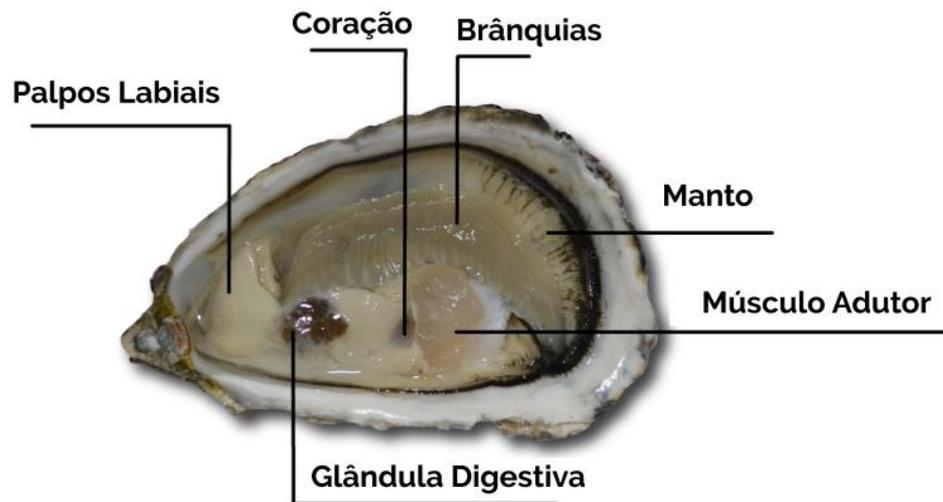


Figura 2 - Identificação dos tecidos da ostra *C. gigas*. (Fonte: acervo LABCAI).

O RNA total das amostras coletadas foi extraído utilizando-se o reagente Qiazol® (Qiagen, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante. Foram separados 100 mg de cada amostra e homogeneizados em 1 mL de Qiazol, com ajuda de um homogeneizador Tissue-Tearor (BioSpec Products, EUA). A pureza e concentração do RNA total extraído foram checadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, EUA) nas razões de 260/280 e 260/230. A partir de 1µg de RNA total, o cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit Quantitect Reverse Transcription® (Qiagen, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante.

3.3 ANÁLISE DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA EM DIFERENTES TECIDOS DE *C. gigas*

Para cada amostra, 100 ng de cDNA foram usados para avaliar os níveis de transcritos das GST por reações de PCR quantitativo (qPCR) utilizando o kit QuantiFast SYBR Green PCR® (Qiagen, Alemanha), em um termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência das reações de qPCR (E) foi determinada para cada par de iniciadores e checada através de uma curva de calibração de cDNA com pool de amostras da ostra, preparada a partir de uma diluição seriada (400 ng/reação; 200 ng/reação; 100 ng/reação; 50 ng/reação e 25 ng/reação).

Para as análises, foram utilizados os genes em que as curvas apresentaram um R² maior ou igual a 0,99 e eficiência entre 98% e 100%. Todos os dados foram relativizados pelo tecido

do coração. Ainda, para assegurar a ausência de produtos não específicos e dímeros, foi realizada uma curva de melting e além disso uma eletroforese em gel de agarose 3% para todos os genes analisados.

Para os calculados de nível de transcritos foi utilizado o método $2^{-\Delta Ct}$, os valores de CT (*Cycle threshold*) gerados foram normalizados pelo gene constitutivo ribossomal *60_S*, escolhido pelo método do 2^{-Cq} de acordo com o proposto por Schmittgen e Livak, (2008).

3.4 ESTATÍSTICA DE DADOS

A fim de detectar possíveis *outliers*, o teste de Grubbs foi aplicado. As análises estatísticas foram realizadas a partir de testes de normalidade e testes paramétricos ou não-paramétricos. Para testar normalidade e homocedasticidade, foram realizados os testes de D'Agostino - Pearson e Levene, respectivamente. Quando necessário, os dados foram submetidos à transformação logarítmica, de raiz quadrada, ou inversa. Para os dados normais e homocedásticos, foi aplicada a análise paramétrica de ANOVA de uma via, seguida de teste de comparação múltipla de Tukey, para comparar os níveis dos transcritos em diferentes tecidos. Quando não normais ou homocedásticos, mesmo após transformações, foi aplicado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Foi considerado um nível de significância $p \leq 0,05$, e as análises foram realizadas com auxílio dos *softwares* Statistica 6 (Statsoft) e GraphPad Prism 7 (GraphPad Software).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INICIADORES

Foram desenhados iniciadores para as 25 sequências identificadas pelo estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, além de um gene normalizador *ribossomal 60_S*. Os iniciadores, suas respectivas sequências e tamanho dos amplicons estão descritos na Tabela 2.

Devido à semelhança entre algumas isoformas, foi possível desenhar iniciadores para um total de 19 sequências dessas 25. Para as isoformas GSTÔmega GSTO.1 e GSTO.3; GSTRho 2.A; GSTDelta; GSTPi 1 e GSTTeta 2B não foi possível realizar iniciadores específicos.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados nas análises de transcrição gênica de isoformas de GST, suas respectivas sequências e tamanho de amplicon.

Nome	Nome do Gene	Sequência 5' - 3'	Amplicon (pb)
genes alvo			
<i>CgGSTK F</i>		AGGACCAAGATGTGAAGGACAGAC	101
<i>CgGSTK R</i>	<i>Glutathione S-transferase Kappa</i>	CTTCCCATTATGTGAGCCACAATCC	
<i>CgGSTO.2 F</i>		TTCCCACACCTAAGCTCTTGATGAA	111
<i>CgGSTO.2_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Ômega 2</i>	TCCCGCTCTAAGTGACGAGAAGAAATG	
<i>CgGSTO.4A F</i>		TGCCGACCCAACAATCATTG	96
<i>CgGSTO.4A R</i>	<i>Glutathione S-transferase Ômega 4A</i>	GAGCATACGGACAGAACCTCAT	
<i>CgGSTR.1A F</i>		CGACAAAGGGACACAACCTCATTC	104

<i>CgGSTR.1A_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Sigma 1A</i>	CCAATACTACCTTCTGTTGCATGTTG	
<i>CgGSTR.1B_F</i>		CCTGCTGGAAGCCAATGATAG	92
<i>CgGSTR.1B_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Rho 1A</i>	CCCTTTGTGTTCCCTTGTTGCT	
<i>CgGSTS.1A_F</i>		GCCAGCTACCGACTTCACTACTT	122
<i>CgGSTS.1A_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Rho 1B</i>	ACATCAGTCCATTCACCCTGAGTAAC	
<i>CgGSTA.1A_F</i>		GCCCATCTGACCTACTTTAATGGAAGA	111
<i>CgGSTA.1A_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Alfa 1A</i>	AAACGGTTGCCGCTCTGTAAAG	
<i>CgGSTA.1B_F</i>		AGGTGCTCCTGTCTGTGT	67
<i>CgGSTA.1B_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Alfa 1B</i>	TGCTTAACTTCACTGTGGTCATCA	
<i>CgGSTP.2_F</i>		GCGTCCAGAGCTGACATGATAA	116
<i>CgGSTP.2_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Pi 2</i>	CCAGGAAGTTCGGCAATAAATGG	
<i>CgGSTM.1A_F</i>		GAGACAAACCTTGGTTCGCTGGAGATAG	87
<i>CgGSTM.1A_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Mi 1A</i>	GCTTCATCAGTCTGTGCTGGTCCATTA	
<i>CgGSTM.1B_F</i>		GGACCAGCACAAACTGATGAAG	83
<i>CgGSTM.1B_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Mi 1B</i>	GGAGGTTCTCAAATCTCTCCACA	
<i>CgGSTT.1_F</i>		AGTCGCCGAAATGGTCAAACCTACTAGAC	140
<i>CgGSTT.1_R</i>	<i>Glutathione S-transferase Teta 1A</i>	ACATCATCTGTTACGAACTGGGACAA	

<i>CgGSTT.2B F</i>		CTCCGTCGCTGATCTCCTCTGTATTT	107
<i>CgGSTT.2B R</i>	<i>Glutathione S-transferase Teta 2B</i>	CTCGCTCTGCCCATGCCTTTATTT	
<i>CgMGST1.1 F</i>	<i>Glutathione S-transferase Microsomal 1.1</i>	ACCGTCCGCTCAAGGCTTACAAATA	107
<i>CgMGST1.1 R</i>		CTTCTTATCCTCTCCACACGCTCATCC	
<i>CgMGST1.2_F</i>	<i>Glutathione S-transferase Microsomal 1.2</i>	TTGGACAGCCGCTTTGTG	114
<i>CgMGST1.2_R</i>		ACGCCAGCAAGGTAGGAAA	
<i>CgMGST2 F</i>	<i>Glutathione S-transferase Microsomal 2</i>	ACTTCAATGGCTACATAGTCAGCGTCAAAG	115
<i>CgMGST2_R</i>		ACGGCAAGATGTCCAATACCCAGAA	
<i>CgMGST3.1A F</i>	<i>Glutathione S-transferase Microsomal 3.1A</i>	GTTACTACACAGGAGATCCCAGCAA	110
<i>CgMGST3.1A R</i>		GAACTTCAGCAGGTTTCAGAGCAAAG	
<i>CGMGST3.2A F</i>	<i>Glutathione S-transferase Microsomal 3.2A</i>	TCTGCCTGTGCTGGA ACTCTCTAT	116
<i>CGMGST3.2A_R</i>		GCGATCAATGCGACGAGACTGAAA	
<i>CgMGST3.2B_F</i>	<i>Glutathione S-transferase Microsomal 3.2B</i>	GGGTCATTCGGTTACATTGGGT	86
<i>CgMGST3.2B R</i>		TAGTGTGGGAAGACACGGAGTT	

gene normalizador

<i>Cg60s_F</i>	<i>Ribossomal 60S</i>	CATTCAAGCGTTCGGGCAATTA	121
<i>Cg60s_R</i>		TTGGTTACAGGTCCATTCCATCTT	

4.2 ANÁLISES DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE ISOFORMAS DE GST

Neste estudo, foi avaliada a prevalência de dezenove diferentes isoformas de GST de ostras *Crassostrea gigas* em nível basal nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias. Estas isoformas incluem as GST microsossomais: *CgMGST1.1* e *CgMGST1.2*; *CgMGST2*; *CgMGST3.1A*, *CgMGST3.2A* e *CgMGST3.2B*. Uma GST mitocondrial, identificada como Kappa *CgGSTK*. E as citosólicas: duas Ômega *CgGSTO.2* e *CgGSTO.4A*; uma Sigma *CgGSTS*; duas Alfa *CgGSTA.1A* e *CgGSTA.1B*; uma Pi *CgGSTP.2*; duas Mi *CgGSTM.1A* e *CgGSTM.1B*; duas Teta *CgGSTT.1* e *CgGSTT.2B*; e duas Rho-like *CgGSTR.1A* e *CgGSTR.1B*.

Na fase I do processo de biotransformação de xenobióticos, enzimas do complexo citocromo p450, por exemplo, podem atuar tornando compostos mais reativos que podem servir como substrato para as enzimas da fase II. As GST são enzimas diméricas de fase II que catalisam a conjugação do xenobiótico à glutationa (GSH), reduzindo sua toxicidade, aumentando sua hidrofiliabilidade e atuando na sua eliminação para o meio extracelular através de sistemas de transporte (fase III) (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004b; SHEEHAN et al., 2001).

As análises de transcrição gênica das GST, por exemplo, possibilitam utilizá-las como biomarcadores de exposição a xenobióticos em estudos ambientais (GLISIC et al., 2015). Essas enzimas atuam na detoxificação de xenobióticos, como drogas, contaminantes ambientais, pesticidas, herbicidas e compostos carcinogênicos. Além disso, também desempenham funções catalíticas fisiológicas como a isomerização de 3-cetosteróides e a biossíntese de leucotrieno A4 e eicosanóides. Acredita-se também que as GST que têm atividade de peroxidase e desempenham um papel na prevenção do estresse oxidativo (COSTA et al., 2005).

Neste trabalho foram avaliados os níveis de transcritos de diferentes isoformas da família das Glutathione *S*-transferase em seis diferentes tecidos da ostra *C. gigas*. Os resultados foram comparados a funções já descritas na literatura para as isoformas de GST identificadas em outras espécies animais.

4.2.1 GST KAPPA

Com relação à isoforma mitocondrial *GST Kappa* (*GST K*) (Figura 3), foi possível observar um maior nível de transcritos de cerca de três vezes, em glândula digestiva, quando comparada aos outros tecidos. *GST Kappa* diverge das GSTs citosólicas, pois pode ser encontrada nas mitocôndrias e nos peroxissomos e pertence a uma família antiga de enzimas com ortólogos em bactérias e eucariotos (CHAURASIA et al., 2016; SANDAMALIKA et al., 2018).

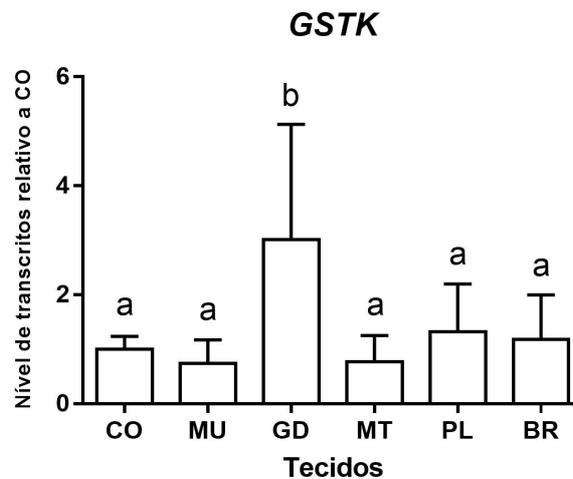


Figura 3. Nível de transcritos do gene *GST Kappa*, nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *Crassostrea gigas*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos para $p < 0,05$. Dados demonstrados como média \pm desvio padrão.

Esses resultados corroboram os estudos realizados por Sandamalika et al. (2018), que mostram que a *GST Kappa* é altamente expressa no trato digestório de abalones (*Haliotis discus discus*). Esses resultados sugerem um papel de detoxificação exercido por essa isoforma, visto que as glândulas digestivas dos animais aquáticos geralmente estão associadas ao acúmulo e

detoxificação de compostos nocivos aos organismos, como por exemplo, os xenobióticos. Esses tecidos podem ainda estar relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), devido à respiração oxidativa. (SANDAMALIKA et al., 2018). Como a GST utiliza GSH para a conjugação com compostos eletrofilicos, sugere-se que a GST mitocondrial pode também desempenhar um papel importante na defesa contra o estresse químico e oxidativo (CHAURASIA et al., 2016; RAZA et al., 2002).

Como segundo Petit et al. (2009) a GST Kappa possui também uma atividade peroxidase, ela pode ter um papel importante na detoxificação de peróxidos lipídicos gerados em peroxissomos e/ou mitocôndrias (MOREL; ANINAT, 2011). Devido ao fato de essa isoforma estar presente nas duas organelas, presume-se que sua função também possa estar associada à beta-oxidação de ácidos graxos. No entanto, são necessários mais estudos que elucidem esses mecanismos. (AWASTHI, 2006).

4.2.2 GST ÔMEGA

Na análise das isoformas de *GST Ômega* (*GSTO*) de *C. gigas*, foi possível observar diferenças estatísticas nos níveis de transcritos para o gene *GSTO.2*, onde observou-se um valor de cerca de 13,6 vezes mais alto em glândula digestiva comparado aos outros tecidos (Figura 4A). Já para o gene *GSTO.4A* (Figura 4B), os níveis de transcritos em glândula digestiva (10 vezes) e palpos labiais foram (17,5 vezes) maiores do que os níveis no coração e músculo, não diferindo dos outros tecidos analisados.

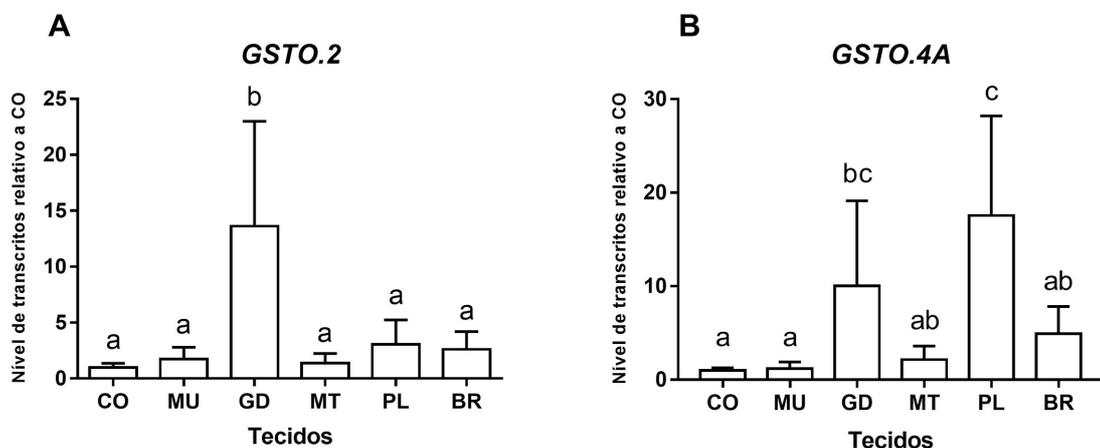


Figura 4. Nível de transcritos do gene *GST Ômega GSTO.2* (A) e *GSTO.4A* (B), nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *Crassostrea gigas*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos para $p < 0,05$. Dados demonstrados como média \pm desvio padrão.

A GST Ômega é uma isoforma citosólica com ampla distribuição entre os grupos animais. É encontrada em insetos, vermes e mamíferos. Em humanos, GSTO1-1 mostra as atividades de tiol transferase e desidroascorbato redutase e assim pode ser considerada uma enzima com papel no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo. Além disso acredita-se que as GST Ômega tenham um papel de modulação do canal iônico (AWASTHI, 2006; BOARD et al., 2000; DULHUNTY et al., 2000).

Além de desempenhar um papel significativo na resposta celular ao estresse oxidativo, e de sua clássica função de detoxificação, é sugerido por Jayasinghe et al. (2016) que a GST Ômega tem a capacidade de prevenção contra metais traço e também pode estar envolvida no sistema de defesa imune em condições patológicas em peixes *Sebastes schlegelii*. Em bivalves, como o abalone *H. discus discus*, a GST Ômega (*HdGSTO1*) desempenha um papel de sequestro de espécies reativas de oxigênio (ERO) quando o animal é exposto a agentes indutores de radicais livres (WAN et al., 2009). Em ostras do gênero *Crassostrea*, os níveis de transcrição gênica de *GST Ômega* frequentemente são alterados frente à exposição aos mais variados contaminantes, como hidrocarbonetos, esgoto sanitário, detergentes e fármacos (DANIELLI et al., 2017; FLORES-NUNES et al., 2015; LIMA et al., 2018; 2019; LÜCHMANN et al., 2014; MEDEIROS et al., 2008; SERRANO et al., 2015; 2018; ZACCHI et al., 2017). Esses resultados sugerem a atuação dessas isoformas no metabolismo de biotransformação de espécies do gênero *Crassostrea*, e conseqüentemente, seu uso como potencial biomarcadores de contaminação aquática.

O uso de *GST Ômega* em glândula digestiva de ostras *C. gigas* foi sugerido como potencial biomarcador de exposição a contaminantes, a partir de resultados de expressão de mRNA dessa isoforma (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004b), e uma vez que a glândula digestiva é um dos principais tecidos de metabolização de xenobióticos e da atuação de enzimas de biotransformação em moluscos (YAO et al., 2017). Entretanto, estudos realizados por Lüchmann et al. (2014), observaram maiores quantidades de respostas transcricionais de *GSTO-like* em brânquias de ostras *C. gasar* expostas a contaminantes, quando comparadas às respostas em glândula digestiva. Além disso, outros estudos utilizando brânquias de bivalves expostas a

contaminantes, destacam a sensibilidade do uso desse tecido em estudos com biomarcadores de contaminação aquática, incluindo isoformas de *GST* (DANIELLI et al., 2017; LIMA et al., 2018; 2019; PIAZZA et al., 2016; ZACCHI et al., 2017; 2018). Os maiores níveis basais de diversas isoformas de *GST*, incluindo *GSTO*, encontrados em glândulas digestivas no presente estudo, podem estar relacionados à maior necessidade basal neste tecido.

4.2.3 GST SIGMA

O nível basal de transcritos de *GST Sigma* foi 6,5 vezes maior na glândula digestiva de *C. gigas* do que nos tecidos do músculo, manto e palpos labiais (Figura 5).

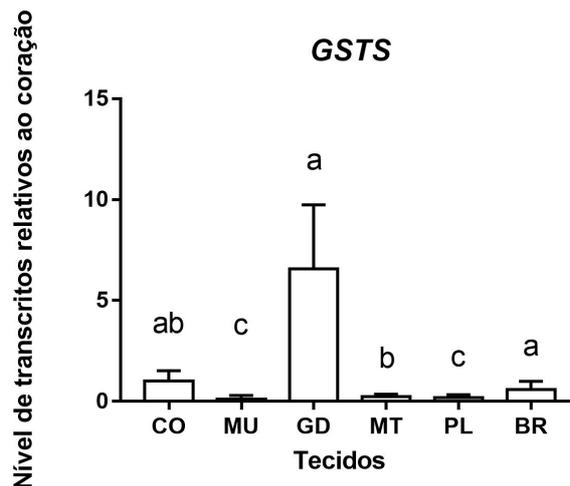


Figura 5. Nível de transcritos do gene *GST Sigma*, nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *Crassostrea gigas*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos para $p < 0,05$. Dados demonstrados como média \pm desvio padrão.

A classificação e função das GST Sigma nos grupos animais ainda é bastante confusa. Em moscas *Drosophila*, a expressão específica do gene *DmGSTS1-1* em músculos de vôo indiretos assíncronos foi relacionada à proteção desses tecidos contra danos oxidativos ocasionados durante a contração muscular, necessariamente repetitiva (AWASTHI, 2006; WAN; WHANG; LEE, 2008b). Em ratos, a enzima conhecida como prostaglandina D2 sintase dependente de GSH é classificada como uma GST Sigma (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; THOMSON; MEYER; HAYES, 1998; AWASTHI, 2006). Uma relação entre as GST

Sigma de helmintos e uma prostaglandina H-E-isomerase dependente de GSH também foi revelada, a partir da purificação da proteína de nematoda *Ascaridia galli* e posterior confirmação como sendo uma GST da classe Sigma (MEYER et al., 1996; THOMSON; MEYER; HAYES, 1998). Baseados nessas informações, alguns genes anotados como prostaglandinas sintases em moluscos bivalves podem ser, na verdade, isoformas de GST Sigma, ou vice-versa. A classificação dessa isoforma em *C. gigas* nos nossos estudos, obedeceu a critérios baseados na anotação pré-estabelecida de outros animais, entretanto, mais estudos envolvendo esses genes em *C. gigas* são necessários para elucidar as classificações.

Quanto à função em moluscos, sugere-se que essa isoforma tenha um papel funcional na proteção contra a toxicidade de xenobióticos, dentre eles, contaminantes orgânicos e metais traço, e também participe do sistema de defesa antioxidante (UMASUTHAN et al. 2012; ZHANG et al., 2012b; WAN; WHANG; LEE, 2008b).

Em *Ruditapes philippinarum*, um estudo da transcrição diferencial basal deste gene mostrou maiores níveis de transcritos em brânquias (UMASUTHAN et al., 2012). Já no bivalve *Venerupis philippinarum*, em estudo realizado com isoformas de GST, incluindo uma *GST Sigma* (*VpGSTS1*, *VpGSTO*, *VpGSTMi*, *VpGSTM* e *VpGSTR*), houve aumento nos níveis de transcritos na glândula digestiva de animais expostos a cobre e Benzo(a)pireno, sugerindo um importante papel dessas isoformas no processo de biotransformação desses compostos (ZHANG et al., 2012b). A expressão de mRNA de *GST Sigma* em glândulas digestivas de *C. gigas* é sugerida como um potencial biomarcador para uso em programas de monitoramento de exposição a pesticidas (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004b). Apesar do seu potencial uso como biomarcadora de contaminação, são necessários mais estudos funcionais acerca da isoforma de *GST Sigma* de *C. gigas* que possam também auxiliar na sua classificação.

A alta transcrição de *GST Sigma* na glândula digestiva pode sugerir que a sensibilidade desse tecido frente a uma exposição a contaminantes venha a ser menor, indicando menores percepções na variação de transcrição gênica dos grupos expostos quando comparados aos grupos controle. Em estudos com biomarcadores, o uso de tecidos com níveis de transcrição de GST basal mais baixos, como as brânquias, por exemplo, pode levar a uma maior facilidade de observação de variações após exposição aos contaminantes, corroborando resultados de estudos anteriores supracitados.

4.2.4 GST TETA

Para o gene *GSTTeta.1* (figura 6A), o nível de transcritos foi cerca de 22 vezes mais alto na glândula digestiva de *C. gigas* do que nos outros tecidos. Já para a isoforma *GSTTeta.2B* (Figura 6B) a transcrição gênica em glândula digestiva foi 7,1 vezes maior quando comparada ao coração, diferindo estatisticamente de todos os demais tecidos.

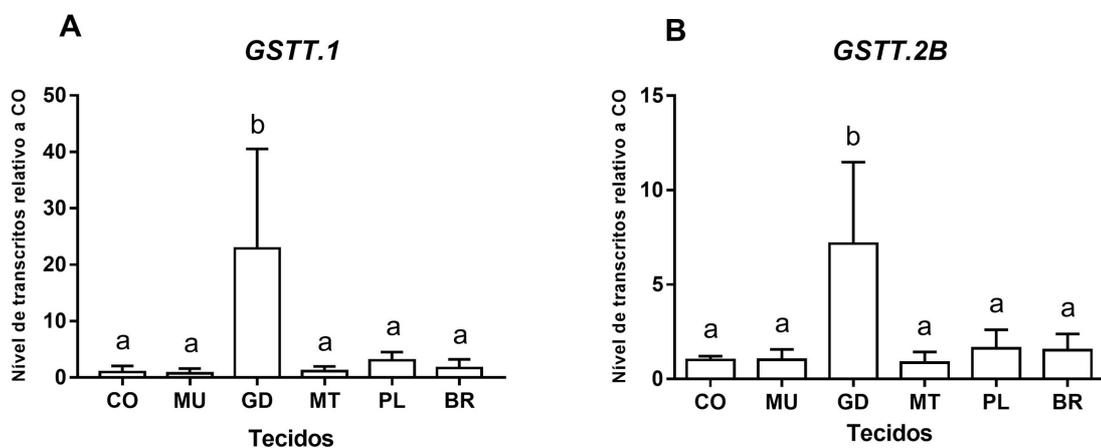


Figura 6. Nível de transcritos do gene *GSTTeta GSTT.1* (A) e *GSTT.2B* (B), nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *Crassostrea gigas*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos para $p < 0,05$. Dados demonstrados como média \pm desvio padrão.

Uma prevalência de *GST Teta* em glândulas digestivas de *C. gigas* foi observada no presente estudo. Sugere-se que as isoformas *GSTT1-1* e *GSTT2-2* em humanos tenham papel de detoxificação. Há indícios de que essas isoformas, em humanos, são capazes de translocar-se do citosol para o núcleo, em resposta ao tratamento com drogas ou outros estressores celulares, possivelmente atuando como transportadores de prostaglandinas. Essas isoformas estão presentes em altas quantidades no estômago de humanos (AWASTHI, 2006).

Além disso, foram observados altos níveis de transcritos de *GSTT1a* em fígado de peixe-zebra (*Danio rerio*) de sexo masculino e feminino, sugerindo participações dessa isoforma no metabolismo de biotransformação de xenobióticos, semelhante à *GSTT1* de humanos (GLISIC

et al., 2015). Em peixes *Sebastes schlegelii* *RfGSTT* foi descrita com função antioxidante para H_2O_2 e metais traço (JAYASINGHE et al., 2016).

Em camarões *Fenneropenaeus chinensis*, *GST Teta* é um gene de alta nível de transcritos, e pode, portanto, desempenhar papéis importantes na metabolização de compostos eletrofílicos tóxicos endógenos (REN et al., 2009). No bicho da seda *Bombyx mori*, os resultados também parecem demonstrar funções relacionadas aos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo e no metabolismo dos produtos de peroxidação lipídica (YAMAMOTO et al., 2005).

A prevalência de *GST Teta* em estômago de humanos e, em fígado de peixes corrobora a prevalência de *GST Teta* em glândula digestiva de *C. gigas*, observada no presente estudo. Baseado também em funções descritas para essa isoforma em invertebrados, como camarões e bicho da seda, sugere-se que as *GST Teta*, podem, portanto, possuir funções semelhantes relacionadas à biotransformação e detoxificação de xenobióticos em glândulas digestivas de *C. gigas*.

4.2.5 GST RHO - LIKE

Este estudo avaliou duas isoformas de *GST Rho - like* em ostras *C. gigas*, nomeadas como *GSTR.1A* e *GSTR.1B*. A isoforma *GSTR.1A* (figura 7A) não apresentou prevalência de transcrição em nenhum dos tecidos analisados, e *GSTR.1B* (figura 7B) apresentou níveis de transcritos maiores em glândula digestiva em comparação com o músculo e em brânquias, em comparação com o músculo e manto.

Esta isoforma é classicamente encontrada em peixes teleósteos, onde sua função é atribuída à detoxificação de compostos (KONISHI et al., 2005; LIANG et al., 2007; TRUTE et al., 2007). Por não possui homólogos em mamíferos, acreditava-se que essa era uma isoforma específica de teleósteos, sendo descrita em muitas espécies, tais como: tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*; tilápia azul *Oreochromis aureus* (YU et al., 2014), *Carassius auratus* (HAO et al., 2008) e peixe-zebra *Danio rerio* (GLISIC et al., 2015; TIERBACH et al., 2018). Também foi identificada em *Sebastes schlegelii*, onde sua capacidade de proteção contra o estresse oxidativo e metais, como Cd, Cu e Zn, foi observada *in vitro* (JAYASINGHE et al., 2016).

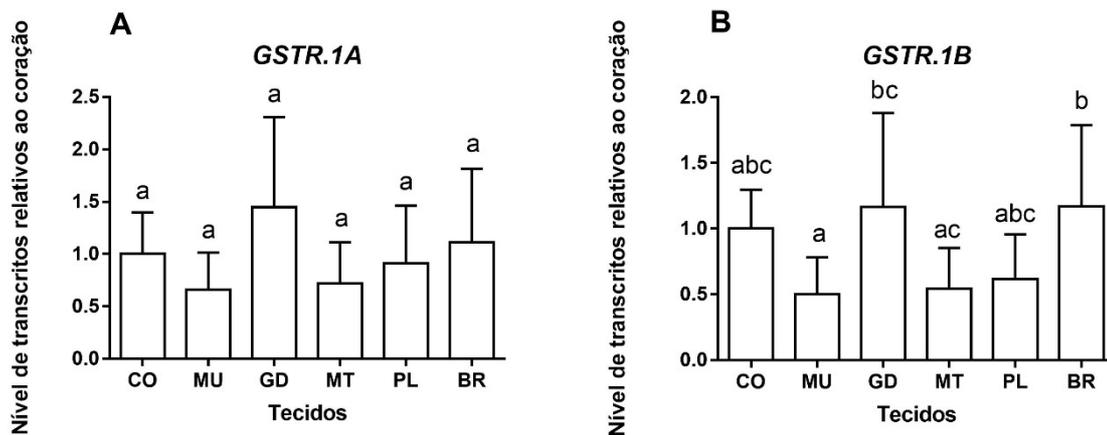


Figura 7. Nível de transcritos do gene *GSTRHO* - like *GSTR.1A* (A) e *GSTR.1B* (B), nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *Crassostrea gigas*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos para $p < 0,05$. Dados demonstrados como média \pm desvio padrão.

Apesar da predominância dessa isoforma em peixes, a GST Rho foi posteriormente descrita em outros grupos animais. Em anfioxo *Branchiostoma belcheri*, a GST *AmphiGST-1* foi classificada como uma *GST Rho*. Essa isoforma foi amplamente expressa no ceco hepático dos anfioxos, órgão funcionalmente sugerido como equivalente ao fígado dos vertebrados (FAN et al., 2007).

Além disso, foi identificada na espécie de bivalve *Laternula elliptica*, e nomeada como GST Rho (PARK et al., 2009). No entanto, em estudos realizados recentemente por PARK et al. (2013), a partir de análises cristalográficas da proteína, modificações no sítio-H do domínio C-terminal foram observadas, sugerindo a reclassificação dessa isoforma como uma nova GST Rho específica de bivalves. GSTR foi ainda, posteriormente, identificada e nomeada em vieiras *C. farreri* onde a prevalência de transcrição do gene foi observada em glândulas digestivas (YAO et al., 2017).

Há inconsistências quanto à classificação de *GST Rho* nos grupos animais e a sua classificação em outras espécies, incluindo os bivalves, foi realizada baseada em similaridade de sequência às dos peixes teleósteos. Ainda não se sabe se esses genes são funcionalmente semelhantes, entretanto, sugere-se à isoforma GST Rho de bivalves, função relacionada aos mecanismos de detoxificação (PARK et al., 2013), o que pode estar relacionado aos maiores níveis de transcritos de *GSTR.1B* em glândula digestiva e brânquias de *C. gigas*, tecidos comumente utilizados em estudos que avaliam esses mecanismos em bivalves, porém por estar

presente em níveis basais na ostra, essa isoforma pode ter também algum outro papel metabólico ainda desconhecido.

Além disso, o padrão de transcrição observado nas *GST Rho 1A* e *1B* no presente estudo foi semelhante, esses resultados contribuem e reiteram a classificação preliminar realizada por nosso grupo de pesquisa de que ambas isoformas são pertencentes ao mesmo grupo, e sugere papéis semelhantes de *GST Rho* nos tecidos avaliados.

4.2.6 GST MI

Foram analisadas duas isoformas diferentes de *GST Mi* em *C. gigas*: *GSTM.1A* e *GSTM.1B*. Para *GSTM.1A* (Figura 8A), não houve prevalência em nenhum dos tecidos analisados. *GSTM.1B* (Figura 8B) apresentou níveis de transcritos 2,1 vezes maiores no músculo adutor do que coração, com diferenças também com relação ao manto, palpos labiais e brânquias. Ainda, os níveis de transcritos em glândula digestiva foram mais altos quando comparados aos tecidos do manto, palpos labiais e brânquias.

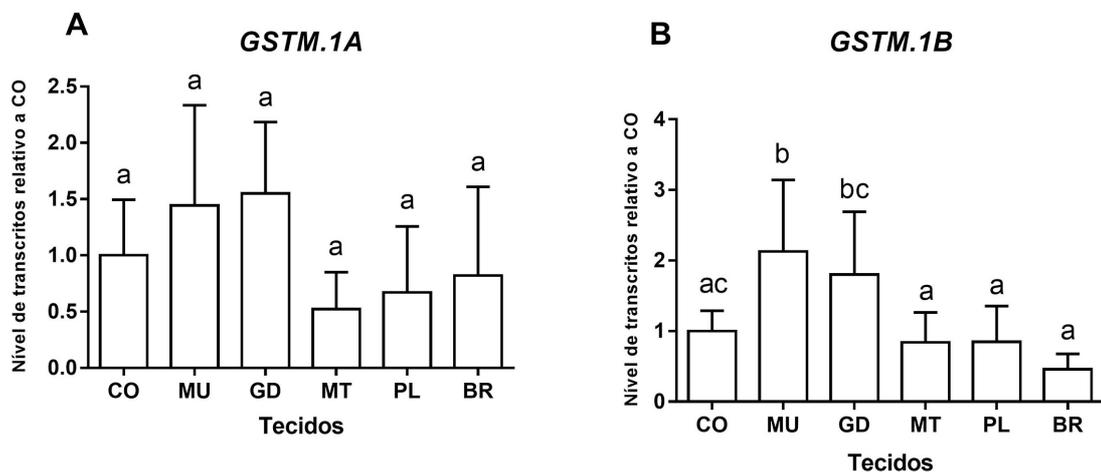


Figura 8. Nível de transcritos do gene *GST Mi* *GSTM.1A* (A) e *GSTM.1B* (B), nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *Crassostrea gigas*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos para $p < 0,05$. Dados demonstrados como média \pm desvio padrão.

As GST Alfa, Mi e Pi são muito abundantes nos vertebrados e são conhecidas por catalisar reações de detoxificação nesses animais. Para *GSTM*, em humanos, é descrita uma importância relacionada a doenças causadas por estresse oxidativo, devido à sua atividade na participação de remoção de hidroperóxidos de DNA (AWASTHI, 2006).

Em invertebrados, também foram descritas *GSTM*. Em camarão *Litopenaeus vannamei*, houve prevalência de transcritos dessa isoforma em hepatopâncreas e brânquias em comparação com hemócitos e músculo (CONTRERAS-VERGARA et al., 2004). Segundo Ren e colaboradores (2009) as isoformas de *GST Mi* e *GST Teta* desempenham um papel importante nas reações de defesa e detoxificação no camarão *Fenneropenaeus chinensis*, cuja função inferida foi relacionada à eliminação do excesso de EROs produzidas após infecção bacteriana, quando desafiado com *Vibrio anguillarum*.

Em moluscos gastrópodes da espécie *Thais clavigera*, a isoforma *Tc-GSTM* foi predominantemente expressa no tecido das brânquias, músculo e rins (RHEE et al., 2008). Já em abalones (*H. discus discus*) houve um maior nível de transcritos do gene *HdGSTM1* no tecido das brânquias e gônadas, e no trato digestório houve uma prevalência moderada (WAN; WHANG; LEE, 2008a).

No presente estudo, houve uma pequena prevalência do gene *GSTM.1B* em músculo adutor e glândula digestiva de *C. gigas*. É importante destacar que os padrões dos transcritos basais observados nas duas isoformas de *GSTM.1A* e *GSTM.1B* foram semelhantes, o que ajuda a suportar a classificação preliminar realizada por nosso grupo de pesquisa, de ambas sequências como pertencentes ao mesmo grupo de GST.

4.2.7 GST PI

Os níveis de transcritos do gene *GSTP2* apresentaram-se mais altos nos tecidos do músculo e da glândula digestiva e músculo adutor, quando comparados com o tecido das brânquias (Figura 9).

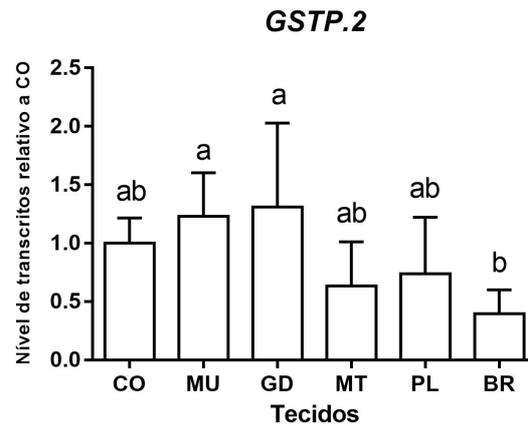


Figura 9. Nível de transcritos do gene *GST Pi GSTP.2*, nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *Crassostrea gigas*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos para $p < 0,05$. Dados demonstrados como média \pm desvio padrão.

Os genes referentes à classe Pi das GST de vertebrados possuem uma sequência semelhante à ARE (elemento de resposta antioxidante) nas suas regiões promotoras. É possível que esta sequência seja um local alvo conservado para Nrf2 nos genes GST de classe Pi, o que sugere de um papel funcional para Nrf2 e o ARE na regulação da expressão do gene GSTP1 humano (AWASTHI, 2006).

Segundo Glisic et al. (2015), há envolvimento das classes *GstPi*, *GstT1a*, *GstR1*, *MGST3a* e *MGST3b* na biotransformação de xenobióticos, com base em sua alta expressão em peixe zebra (*Danio rerio*) e em sua similaridade funcional aos genes ortólogos de humanos. Em moluscos bivalves, mudanças transcricionais do gene da *GST Pi* foram demonstradas em brânquias e glândulas digestivas de animais expostos a xenobióticos (SERRANO et al., 2015; FLORES-NUNES et al., 2015; LÜCHMANN et al., 2014). No entanto, são inexistentes estudos que avaliaram os níveis de transcritos de GSTP em músculo de ostras.

As isoformas GST Pi, GST Mi e GST Alfa, podem metabolizar a conjugação do 4-hidroxinonal, um substrato clássico dessas isoformas em mamíferos (ÅLIN; DANIELSON; MANNERVIK, 1985; DANIELSON; ESTERBAUER; MANNERVIK, 1987; SINGHAL et al., 1994) e *Caenorhabditis elegans* (Engle et al., 2001). A beta oxidação de ácidos graxos pode gerar produtos tóxicos, como o 4-hidroxinonal (DANIELSON; MANNERVIK, 1985; DANIELSON; ESTERBAUER; MANNERVIK, 1987; SINGHAL et al., 1994). Houve uma pequena prevalência nos tecidos do músculo adutor e glândula digestiva das isoformas *GSTP2* e *GSTM.1B* avaliadas no presente estudo, com padrões muito semelhantes entre as isoformas.

Os níveis basais mais altos de *GSTP2* e *GSTM.1B* em ambos tecidos podem estar relacionados a uma maior necessidade de conjugação de compostos provenientes da beta oxidação dos ácidos graxos, como o 4-hidroxinonenal. Corroborando essa hipótese, o processo de beta oxidação dos ácidos graxos é frequente para geração de energia nos músculos adutores, cuja principal função nos bivalves é o controle do movimento de abertura e fechamento das valvas (ZHAO et al., 2015), e nas glândulas, para a digestão dos lipídios da dieta (GERDOL et al., 2017).

4.2.8 GST ALFA

As isoformas de *GST Alfa* analisadas no presente estudo (*GSTA.1A* e *GSTA.1B*), não apresentaram diferenças estatísticas quanto aos níveis de transcritos entre os tecidos de *C. gigas* (Figura 10). As classes de GST mais prevalentes em mamíferos são as Mi, Pi e Alfa, sendo esta última correspondente por até 3% das proteínas solúveis no fígado de humanos, o principal local de biotransformação de xenobióticos (AWASTHI, 2006). Essas enzimas também estão intimamente envolvidas na biossíntese de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona e progesterona, bem como na degradação da tirosina (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

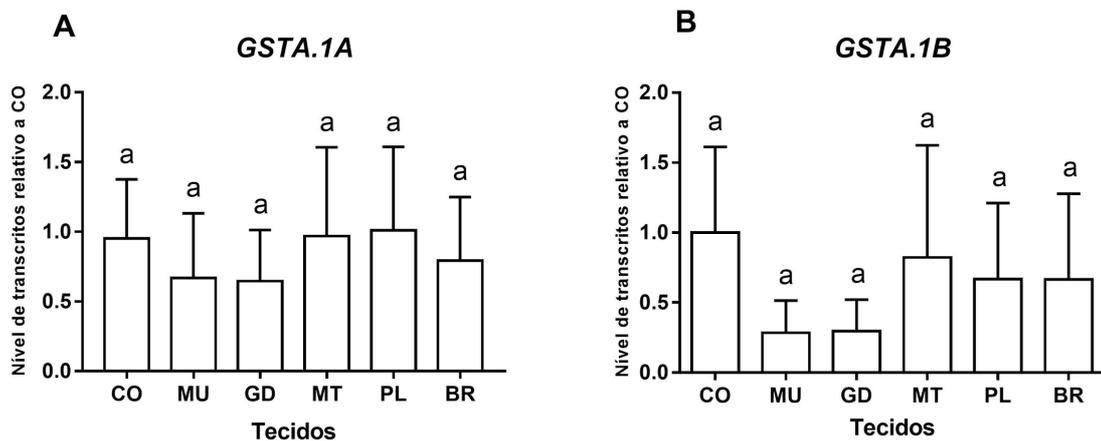


Figura 10. Nível de transcritos do gene *GST Alfa* *GSTA.1A* (A) e *GSTA.1B* (B), nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *Crassostrea gigas*. Dados demonstrados como média \pm desvio padrão.

As GST Alfa de humanos possuem uma subclasse especializada na conjugação de produtos de peroxidação lipídica eletrofílica, ou seja, apresentam atividade peroxidase. Ainda,

atuam como isomerases na síntese de hormônios esteroides, como a testosterona e progesterona. Algumas GST Alfa de humanos são ainda, relacionadas ao metabolismo do 4-hidroxinonal (4-HNE) e na proteção contra o estresse oxidativo (AWASTHI, 2006). Em ratos, uma isoforma de GST Alfa (GSTA4-4) também parece estar relacionada a parte de um mecanismo de defesa homeostático auto regulatório contra produtos de peroxidação lipídica (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

Em fração citosólica hepática de peixes *Micropterus salmoides*, foi demonstrado que as GST Alfa são a principal isoforma de GST no fígado e catalisam a conjugação do 4-hidroxinonal dependente de GSH (DOI et al., 2004). Na espécie *Rivulus marmoratus*, foram demonstrados altos níveis de transcrição do gene *RmGST Alfa* nos tecidos das gônadas, intestino e fígado, e os resultados foram relacionados à detoxificação e proteção contra espécies reativas de oxigênio e produtos da peroxidação lipídica (LEE et al., 2005).

No presente estudo, apesar de os genes da *GST Alfa* analisados não terem apresentado diferença estatística basal entre os tecidos, em função da sua importância na conjugação de diversos produtos metabólicos em vertebrados, sugere-se a realização de mais estudo que elucidem funções e avaliem respostas de *GST Alfa* em *C. gigas*.

4.2.9 GSTS MICROSSOMAIS

Para *MGST1.1* (Figura 11A), os níveis de transcritos apresentaram-se mais baixos em músculo adutor quando comparado ao coração, glândula digestiva e brânquias (Figura 11A). Os níveis de transcritos de *MGST1.2* (Figura 11B) foram 2,5 vezes mais altos no tecido do coração do que nos outros tecidos. Com relação ao gene *MGST2* (Figura 11C), houve 31 vezes mais transcritos na glândula digestiva quando comparado ao tecido do coração. Para os genes de GST Microssomais 3, para a isoforma *MGST3.1A* (Figura 11D), houve diferença nos níveis de transcritos em glândula digestiva em comparação ao músculo adutor; para *MGST3.2A* (Figura 11E) no tecido do manto houve maior nível de transcrição gênica comparado ao músculo, glândula e brânquia; e para a isoforma *MGST3.2B* (Figura 11F), os níveis apresentaram-se menores em músculo adutor e manto em comparação ao coração.

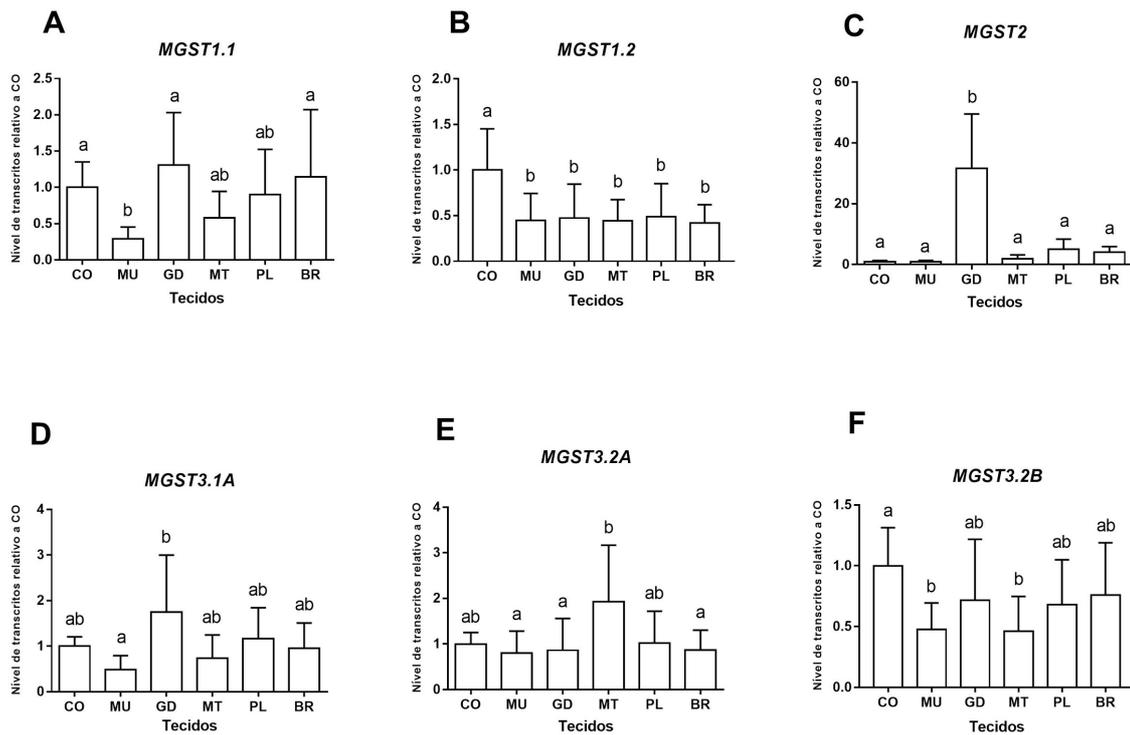


Figura 11. Níveis de transcritos dos genes de *GST* microssomais: *MGST1.1* (A); *MGST1.2* (B); *MGST2* (C); *MGST3.1A* (D); *MGST3.2A*(E); *MGST3.2B*(F), nos tecidos do coração, músculo, glândula digestiva, manto, palpos labiais e brânquias de ostras *Crassostrea gigas*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos para $p < 0,05$. Dados demonstrados como média \pm desvio padrão.

Os membros da superfamília das GST microssomais (MGST), também conhecidos como MAPEG (do inglês *Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism*), são proteínas triméricas integrais de membrana envolvidas no metabolismo da glutathiona e de eicosanoides. São enzimas que participam da detoxificação de compostos, além de atuarem em vias de biossíntese específicas do metabolismo do ácido araquidônico. Já havia sido descritas três GST microssomais em humanos: as MGST1, MGST2 e MGST3 (BRESELL et al., 2005). Em *C. gigas*, nossos estudos identificaram isoformas pertencentes às 3 classes de GST microssomais, nomeadas como: *MGST1.1*, *MGST1.2*, *MGST2*, *MGST3.1A*, *MGST3.2A* e, *MGST3.2B*.

A maioria das MGST está envolvida no metabolismo dos eicosanoides, e faz parte do sistema de biossíntese do ácido araquidônico. Algumas delas possuem funções de detoxificação, incluindo atividade glutathiona peroxidase. Entretanto, um dos papéis fundamentais das MGST envolvem a proteção celular contra danos causados pelo

malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica (AWASTHI, 2006; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

Em peixes, as MGST desempenham um importante papel na detoxificação de xenobióticos e nos mecanismos de defesa antioxidante. Em função disso, a análise da transcrição gênica de *MGST* tem sido utilizada em estudos com biomarcadores de exposição a xenobióticos (KIM et al., 2009; GLISIC et al., 2014).

Em moluscos bivalves, Zhang et al., (2012b) observaram aumento dos níveis de transcritos de *GST microsomal* em glândula digestiva de *Venerupis philippinarum*. Os autores sugerem que a glândula digestiva possa ser o principal local de metabolismo de biotransformação de xenobiótico nesses animais.

Em ostras *C. gasar*, foi observado um aumento dos níveis de transcritos de *GST microsomal 3-like* em brânquias, mas não em glândulas digestivas, após exposição ao fenantreno (LÜCHMANN et al., 2014). Ainda em *C. gasar*, houve aumento nos níveis de transcritos de *MGST-like* em brânquias após exposição a fenantreno (ZACCHI et al., 2017) e pireno (SIEBERT, 2017; ZACCHI, 2017). Os diferentes padrões de transcritos basais das isoformas de *MGST* observados nos tecidos de *C. gigas* no presente estudo podem indicar diferentes funções, relacionadas ou não àquelas já descritas em outras espécies para as MGST (proteção contra a peroxidação lipídica, biotransformação de xenobióticos ou envolvidas em vias de biossíntese do metabolismo de eicosanoides).

Mais estudos são necessários para elucidar as funções de cada uma das isoformas de *MGST* em diferentes tecidos de *C. gigas*. Todavia, respostas frequentes dessas isoformas em ostras expostas a xenobióticos vêm sendo reportadas na literatura, o que sugere o uso das isoformas de GST microsomais como potenciais biomarcadores de contaminação aquática (LÜCHMANN et al., 2014; ZACCHI et al., 2017; ZACCHI, 2017; SIEBERT, 2017).

5. CONCLUSÃO

Este trabalho é parte integrante de um grande estudo envolvendo a família das GST de *Crassostrea gigas*, e que tem como base a identificação e organização prévia das isoformas de Glutathione S-transferase (GST). Para isso, neste estudo, foi realizado o desenho de *primers* específicos para 19 das 25 sequências identificadas e foi feita a análise dos níveis de transcritos nos diferentes tecidos de *C. gigas* por qPCR.

Para sete das isoformas de GST avaliadas, os níveis de transcritos basais apresentaram-se mais altos em glândulas digestivas comparadas aos outros tecidos. Esses tecidos tem sua função descrita como a participação no processo de biotransformação de fase II, ainda se acredita que podem participar de outros metabolismos internos. Em contrapartida, com base em estudos prévios de exposição a contaminantes, as glândulas digestivas normalmente não respondem de maneira tão sensível quanto outros tecidos, como as brânquias, por exemplo. Isso pode indicar que tecidos com menor nível basal de transcritos de isoformas de GST em *C. gigas* e outros moluscos bivalves, possam demonstrar variações frente à exposição aos contaminantes mais facilmente.

Esse estudo mostra uma visão geral da transcrição gênica da família das GSTs e sugere a atuação no metabolismo de compostos endógenos e exógenos em diferentes tecidos de *Crassostrea gigas*. A partir de comparações com outros estudos, bem como da correlação com as funções descritas para outros animais, esse estudo pode auxiliar na escolha de um tecido de acordo com a problemática e o contaminante específicos em estudos com biomarcadores de contaminação aquática ou em trabalhos que avaliem metabolismo endógeno nesses animais. Esses resultados também poderão auxiliar no aprimoramento do uso e aplicação das GST em estudos de biomarcadores de contaminação aquática.

6. REFERÊNCIAS

- ACEB, Associação Cultural e Educacional Brasil. **1º Anuário Brasileiro de Pesca e Aquicultura**, 2014.
- ÅLIN, Per; DANIELSON, U. Helena; MANNERVIK, Bengt. 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. **Febs Letters**, [s.l.], v. 179, n. 2, p.267-270, 7 jan. 1985.
- AWASTHI, Yogesh C.; ed. **Toxicology of Glutathione Transferases**. Boca Raton, Fla, USA: CRC Press, 2006. 375p.
- BELIAEFF, Benoit; BURGEOT, Thierry. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.1316-1322, jun. 2002.
- BOARD, Philip G. et al. Identification, Characterization, and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 275, n. 32, p.24798-24806, 26 abr. 2000.
- BOUTET, Isabelle; TANGUY, Arnaud; MORAGA, Dario. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v.329, p.147-157, 2004a.
- BOUTET, Isabelle; TANGUY, Arnaud; MORAGA, Dario. Characterization and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. **Marine Biology**, v.146, p.53–64, 2004b.
- BRESELL, Anders et al. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. **Febs Journal**, [s.l.], v. 272, n. 7, p.1688-1703, 9 mar. 2005.
- BRULLE, Franck et al. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida coelomocytes*. **Developmental & Comparative Immunology**, [s.l.], v. 32, n. 12, p.1441-1453, jan. 2008.
- CASAN, Companhia Catarinense de Águas e Saneamento. **Notícias**. Disponível em: <<https://www.casan.com.br/noticia/index?url/casan-conclui-mais-uma-obra-de-esgoto-em-florianopolis-e-amplia-a-cobertura-da-cidade-3#0>>. Acesso em: 28 maio 2019.
- CHAURASIA, Mukesh K. et al. In-silico analysis and mRNA modulation of detoxification enzymes GST delta and kappa against various biotic and abiotic oxidative stressors. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 54, p.353-363, jul. 2016.
- CONTRERAS-VERGARA, Carmen A. et al. A mu-class glutathioneS-transferase from the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and active-site structural modeling. **Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.245-252, 2004.
- COSTA, Lucio G. et al (Ed.). **Current Protocols in Toxicology**. John Wiley & Sons, Inc, 2005.

DANIELLI, Naissa M. et al., Contrasting effects of a classic Nrf2 activator, tert-butylhydroquinone, on the glutathione related antioxidant defenses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, **Marine Environmental Research**, v.130, p.142-149, 1 set. 2017.

DANIELSON, U. Helena; ESTERBAUER, Hermann; MANNERVIK, Bengt. Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 247, n. 3, p.707-713, 1 nov. 1987.

DOI, Adriana M. et al. Molecular cloning and characterization of a glutathione S-transferase from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver that is involved in the detoxification of 4-hydroxynonenal. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 67, n. 11, p.2129-2139, jun. 2004.

DOOMS, Maxime; CHANGO, Abalo; ABDEL-NOUR, Afif. Quantitative PCR (qPCR) and the Guide to good practices MIQE: adapting and relevance in the clinical biology context. **Annales de Biologie Clinique**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.265-269, maio 2014.

DULHUNTY, Angela et al. The Glutathione Transferase Structural Family Includes a Nuclear Chloride Channel and a Ryanodine Receptor Calcium Release Channel Modulator. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 276, n. 5, p.3319-3323, 16 out. 2000.

ENGLE, Mark R. et al., Invertebrate glutathione transferases conjugating 4-hydroxynonenal: CeGST 5.4 from *Caenorhabditis elegans*, **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 133, n.244, 2001.

EPAGRI, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese Informativa da Maricultura 2017**.

FAN, Chunxin et al. Identification and expression of a novel class of glutathione-S-transferase from amphioxus *Branchiostoma belcheri* with implications to the origin of vertebrate liver. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 39, n. 2, p.450-461, jan. 2007.

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

FERREIRA, Jaime F., NETO, Francisco M. O., Cultivo de moluscos em Santa Catarina. Em: Barroso, Gilberto Fonseca, Poersch, Luis Henrique da Silva, Cavalli, Ronaldo Oliveira, **Sistemas de cultivos aquícolas na zona costeira do Brasil: Recursos, tecnologias, aspectos ambientais e sócio-econômicos**. Rio de Janeiro, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, v.1, p.87-95, 2007.

FLORES-NUNES, Fabrício et al. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 22, n. 22, p.17386-17396, 14 abr. 2015.

GERDOL, Marco et al. The purple bifurcate mussel *Mytilisepta virgata* gene expression atlas reveals a remarkable tissue functional specialization. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-11, 8 ago. 2017.

GINZINGER, David G. Gene quantification using real-time quantitative PCR. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p.503-512, 1 jun. 2002.

GLISIC, Branka et al. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 158, p.50-62, jan. 2015.

GLISIC, Branka et al. Transcriptional profiles of glutathione-S-Transferase isoforms, Cyp, and AOE genes in atrazine-exposed zebrafish embryos. **Environmental Toxicology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.233-244, 26 ago. 2014.

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

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

HAO, Le et al. The effect of cyanobacterial crude extract on the transcription of GST mu, GST kappa and GST rho in different organs of goldfish (*Carassius auratus*). **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 90, n. 1, p.1-7, out. 2008.

HAYES, John D.; FLANAGAN, Jack U.; JOWSEY, Ian R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45, n.1, p.51-88, 2005.

HOLT, Emily A. & MILLER, Scott W. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. **Nature Education Knowledge** 3(10):8, 2010.

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

HUGGETT, Robert J. et al (Ed.). **Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. NW: Boca Raton, p. 347, 1992.

IMA, Instituto do Meio Ambiente. **Balneabilidade**. Disponível em: <<http://www.ima.sc.gov.br/index.php/ecosistemas/balneabilidade/informacoes>>. Acesso em: 28 maio 2019.

JAYASINGHE, Jeevani D. H. E. et al. Comprehensive characterization of three glutathione S-transferase family proteins from black rockfish (*Sebastes schlegelii*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 189, p.31-43, nov. 2016.

KEPPLER, Charles; RINGWOOD, Amy H. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. **Aquatic Toxicology**, v.54, p. 195-204, 2001.

KETTERMAN, Albert J et al. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.65-74, jan. 2001.

KIM, Jin-hyoung et al. Molecular cloning, phylogenetic analysis and expression of a MAPEG superfamily gene from the pufferfish *Takifugu obscurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 149, n. 3, p.358-362, abr. 2009.

KONISHI, Takafumi et al. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 388, n. 1, p.299-307, 15 maio 2005.

LEE, Young-mi et al. Cloning and expression of alpha class glutathione S-transferase gene from the small hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* (*Cyprinodontiformes, Rivulidae*). **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 51, n. 8-12, p.776-783, jan. 2005.

LIANG, Xu-fang et al. Transcriptional responses of alpha- and rho-class glutathione S-transferase genes in the liver of three freshwater fishes intraperitoneally injected with microcystin-LR: Relationship of inducible expression and tolerance. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.289-298, 2007.

LIMA, Daína et al. Stress responses in *Crassostrea gasar* exposed to combined effects of acute pH changes and phenanthrene. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 678, p.585-593, ago. 2019.

LIMA, Daína et al. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene. **Chemosphere**, [s.l.], v. 209, p.307-318, out. 2018.

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

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

LÜCHMANN, Karim H. **Respostas bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliiana*, expostas a diferentes contaminantes ambientais**. 2012. 178 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

LUCKENBACH, Till.; EPEL, David. ABCB and ABCC type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.294, p.R1919-1929, 2008.

MEDEIROS, Igor D. et al. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.362-365, nov. 2008.

- MEYER, David J. et al. Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 313, n. 1, p.223-227, 1 jan. 1996.
- MOREL, Mélanie et al. The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 66, n. 23, p.3711-3725, 7 ago. 2009.
- MOREL, Fabrice; ANINAT, Caroline. The glutathione transferase kappa family. **Drug Metabolism Reviews**, [s.l.], v. 43, n. 2, p.281-291, 23 mar. 2011.
- NEUMANN, Barbara et al. Future Coastal Population Growth and Exposure to Sea-Level Rise and Coastal Flooding - A Global Assessment. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 3, 11 mar. 2015.
- NUNES, Fabrício F. **Avaliação de respostas bioquímicas, moleculares e da expressão proteômica em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário**. 2013. 183 f. Tese (Doutorado) - Curso de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- NIYOGI, Som et al. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v.52, p.13-26, 2001.
- OOST, Ron van Der; BEYER, Jonny; VERMEULEN, Nico P.e. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.57-149, fev. 2003.
- PEMBLE, Sally E; WARDLE, Anthony F.; TAYLOR, John B. Glutathione S-transferase class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. **Biochemical Journal**, v.319, p.749-754, 1 nov. 1996.
- PETIT, Elise et al. Glutathione transferases kappa 1 and kappa 2 localize in peroxisomes and mitochondria, respectively, and are involved in lipid metabolism and respiration in *Caenorhabditis elegans*. **Febs Journal**, [s.l.], v. 276, n. 18, p.5030-5040, 3 ago. 2009.
- PARK, Ae Kyung et al. The structure of a shellfish specific GST class glutathioneS-transferase from antarctic bivalve *Laternula elliptica* reveals novel active site architecture. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 81, n. 3, p.531-537, 24 dez. 2012.
- PARK, Hyun et al. Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 150, n. 4, p.528-536, nov. 2009.
- PIAZZA, Rômi S. et al. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 177, p.146-155, ago. 2016.
- PIAZZA, Rômi S. **Respostas moleculares, bioquímicas e genotóxicas em vieiras, *Nodipecten nodosus*, expostas ao fenantreno**. 2016. 124 f. Tese (Doutorado) - Curso de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

RAZA, Haider et al. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 366, n. 1, p.45-55, 15 ago. 2002.

REN, Qian et al. A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S-transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 149, n. 4, p.613-623, maio 2009.

RHEE, Jae-sung et al. A Mu-class glutathione S-transferase (GSTM) from the rock shell *Thais clavigera*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 148, n. 3, p.195-203, set. 2008.

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

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

SANDAMALIKA, W. M. Gayashani et al. Molecular characterization of kappa class glutathione S-transferase from the disk abalone (*Haliotis discus discus*) and changes in expression following immune and stress challenges. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 77, p.252-263, jun. 2018

SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, n.6, p.1101–1108, 2008.

SEKOVSKI, Ivan; NEWTON, Alice; DENNISON, William C. Megacities in the coastal zone: Using a driver-pressure-state-impact-response framework to address complex environmental problems. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, [s.l.], v. 96, p.48-59, jan. 2012.

SERRANO, Miguel A. S. et al. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 22, n. 22, p.17375-17385, 18 jan. 2015.

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

SHEEHAN, David et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 360, n. 1, p.1-16, 15 nov. 2001.

SINGHAL, Sharad S. et al. Several Closely Related Glutathione S-Transferase Isozymes Catalyzing Conjugation of 4-Hydroxynonenal Are Differentially Expressed in Human Tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 311, n. 2, p.242-250, jun. 1994.

SIEBERT, Marília N. **ATIVIDADE 7-ETÓXI-RESORUFINA O-DEETILASE EM OSTRAS *Crassostrea* sp. E NÍVEIS DE TRANSCRITOS E ATIVIDADES DE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM OSTRAS *Crassostrea gigas* EXPOSTAS A HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**. 2017. 199 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

THOMSON, Anne M.; MEYER, David J.; HAYES, John D. Sequence, catalytic properties and expression of chicken glutathione-dependent prostaglandin D2 synthase, a novel class Sigma glutathione S-transferase. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 333, n. 2, p.317-325, 15 jul. 1998.

TIERBACH, Alena et al. Glutathione S-Transferase Protein Expression in Different Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 162, n. 2, p.702-712, 19 jan. 2018.

TRUTE, Mary et al. Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 81, n. 2, p.126-136, 28 fev. 2007.

UMASUTHAN, Navaneethaiyer et al. A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Cloning, characterization and transcriptional profiling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, [s.l.], v. 155, n. 4, p.539-550, maio 2012.

VUILLEUMIER, Stephane; PAGNI, Marco. The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 58, n. 2, p.138-146, 1 jan. 2002.

WAGNER, Ulrich; EDWARDS, Robert; DIXON, David P.; MAUCH, Felix. Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-Transferase gene family. **Plant Molecular Biology**, v.49, n.5, p.515-532, 2002.

WAN, Qiang et al. Novel omega glutathione S-transferases in disk abalone: Characterization and protective roles against environmental stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 150, n. 4, p.558-568, nov. 2009.

WAN, Qiang; WHANG, Ilson; LEE, Jehee. Molecular characterization of mu class glutathione-S-transferase from disk abalone (*Haliotis discus discus*), a potential biomarker of endocrine-disrupting chemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 150, n. 2, p.187-199, jun. 2008a.

WAN, Qiang; WHANG, Ilson; LEE, Jehee. Molecular cloning and characterization of three sigma glutathione S-transferases from disk abalone (*Haliotis discus discus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 151, n. 3, p.257-267, nov. 2008b.

YAMAMOTO, Kohji et al. Cloning, expression and characterization of theta-class glutathione S-transferase from the silkworm, *Bombyx mori*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 141, n. 3, p.340-346, jul. 2005.

YAO, Linlin et al. Expression profiles of different glutathione S-transferase isoforms in scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene and chrysene in combination and alone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 142, p.480-488, ago. 2017.

YU, Ying et al. Two homologs of rho-class and polymorphism in alpha-class glutathione S-transferase genes in the liver of three tilapias. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 101, p.213-219, mar. 2014.

ZACCHI, Flávia L. et al. Biochemical and molecular responses in oysters *Crassostrea brasiliiana* collected from estuarine aquaculture areas in Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 135, p.110-118, out. 2018.

ZACCHI, Flávia L. et al. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliiana* exposed to phenanthrene at different salinities. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v.183, p.94-103, 1 fev. 2017.

ZACCHI, Flávia L. **Respostas Moleculares e de Enzimas de Biotransformação em Ostras *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) Expostas a Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e Diferentes Salinidades**. 2017. 205 f. Tese (Doutorado) - Curso de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

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

ZHANG, Linbao et al. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 155, n. 3, p.517-527, abr. 2012b.

ZHAO, Che et al. Morphological and confocal laser scanning microscopic investigations of the adductor muscle-shell interface in scallop. **Microscopy Research and Technique**, [s.l.], v. 78, n. 9, p.761-770, 23 jul. 2015