



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Luana Boeno dos Santos da Silva

**Diversidade molecular e relações evolutivas das principais proteínas
plasmáticas de ostras: dominina e segon**

Florianópolis
2025

Luana Boeno dos Santos da Silva

**Diversidade molecular e relações evolutivas das principais proteínas
plasmáticas de ostras: dominina e segon**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa
Coorientador: MSc. Cássio Barcellos Hervé

Florianópolis

2025

Boeno, Luana

Diversidade molecular e relações evolutivas das principais proteínas plasmáticas de ostras: dominina e segon / Luana Boeno ; orientador, Rafael Diego Rosa, coorientador, Cássio Barcellos Hervé, 2025.

52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

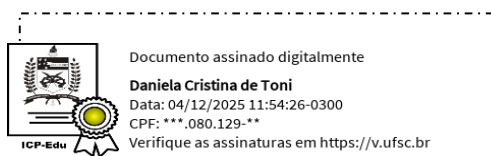
1. Ciências Biológicas. 2. Ostras. 3. relações evolutivas. 4. Diversidade molecular. 5. Proteínas plasmáticas. I. Rosa, Rafael Diego . II. Hervé, Cássio Barcellos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Luana Boeno dos Santos da Silva

**Diversidade molecular e relações evolutivas das principais proteínas
plasmáticas de ostras: dominina e segon**

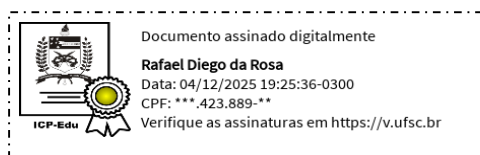
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de
bacharela e aprovada em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 24 de novembro de 2025

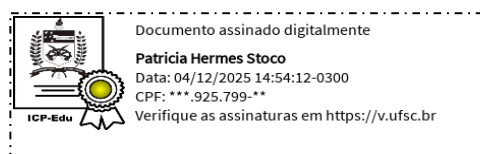


Profa. Dra. Daniela Cristina De Toni
Coordenadora do Curso

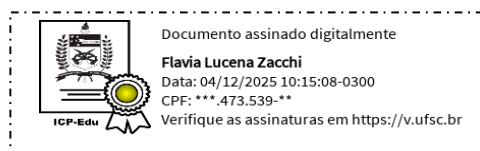
Banca examinadora



Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa
Orientador



Profa. Dra. Patrícia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina



Profa. Dra. Flavia Lucena Zacchi
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2025

RESUMO

As proteínas dominina e segon são os componentes majoritários do plasma de ostreídeos, correspondendo a cerca de 70% das proteínas totais da hemolinfa. As domininas são superóxido dismutases extracelulares que, no entanto, não possuem atividade típica de SOD. Provavelmente, tanto a dominina quanto a segon apresentam atividade associada às suas propriedades de ligação a metais. Embora sejam as proteínas mais abundantes do plasma, o conhecimento sobre essas moléculas permanece escasso, sendo que a proteína segon foi, até o momento, caracterizada apenas na espécie *Crassostrea virginica*. Diante disso, este trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade molecular e inferir as relações evolutivas de proteínas pertencentes as famílias dominina e segon em ostras. Para isso, foram realizadas buscas *in silico* em bancos de dados anotados e não anotados, bem como em genomas de ostras e de outros moluscos. Essa prospecção resultou na identificação de 100 sequências de dominina (14 espécies) e 30 de segon (13 espécies) em ostras. Foi identificada também uma sequência similar à dominina em mexilhão. Posteriormente, a caracterização molecular *in silico* demonstrou que a dominina é estruturalmente conservada, enquanto a segon possui uma região N-terminal variável em nível de gênero e uma região C-terminal conservada entre as espécies. A predição por domínios proteicos identificou que todas as proteínas dominina e segon, com exceção da segon de *C. virginica*, apresentam um domínio C-terminal cobre, zinco superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD; pfam: PF00080). As análises da estrutura gênica e de sintenia revelaram que os genes dominina e segon são colineares entre as espécies de ostras e que os quatro últimos éxons de dominina são homólogos aos quatro últimos éxons de segon. As análises evolutivas sugerem que dominina seja um gene mais antigo que a segon e que sofreu expansão em Ostreidae. Além disso, a segon teria surgido após um evento de duplicação parcial de um gene dominina na ostra ancestral. Este estudo, portanto, abrange o conhecimento molecular e evolutivo das proteínas mais abundantes do plasma de ostras.

Palavras-chave: moluscos bivalves, sistema imune e evolução molecular.

ABSTRACT

Dominin and segon proteins are the major components of ostreid plasma, accounting for approximately 70% of total hemolymph proteins. Dominins are extracellular superoxide dismutases that, however, lack typical SOD activity. Both dominin and segon likely exhibit activity associated with their metal-binding properties. Although they are the most abundant plasma proteins, knowledge regarding these molecules remains scarce, and the segon protein has, to date, been characterized only in the species *Crassostrea virginica*. Therefore, this study aimed to characterize the molecular diversity and infer the evolutionary relationships of proteins belonging to the dominin and segon families in oysters. To this end, *in silico* searches were performed in annotated and unannotated databases, as well as in the genomes of oysters and other mollusks. This screening resulted in the identification of 100 dominin sequences (14 species) and 30 segon sequences (13 species) in oysters. A dominin-like sequence was also identified in a mussel. Subsequently, *in silico* molecular characterization demonstrated that dominin is structurally conserved, whereas segon possesses an N-terminal region variable at the genus level and a C-terminal region conserved among species. Protein domain prediction identified that all dominin and segon proteins, with the exception of *C. virginica* segon, contain a C-terminal Copper/Zinc Superoxide Dismutase (Cu/Zn-SOD; Pfam: PF00080) domain. Gene structure and synteny analyses revealed that dominin and segon genes are collinear among oyster species and that the last four exons of dominin are homologous to the last four exons of segon. Evolutionary analyses suggest that dominin is an older gene than segon and underwent expansion in Ostreidae. Furthermore, segon likely emerged following a partial duplication event of a dominin gene in the ancestral oyster. Therefore, this study expands the molecular and evolutionary knowledge of the most abundant proteins in oyster plasma.

Keywords: bivalve mollusks, immune system and molecular evolution.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 HEMÓCITOS.....	12
1.2 PRINCIPAIS RESPOSTAS DE DEFESA DE OSTRAS	15
1.3 HEMOLINFA E SUAS PRINCIPAIS PROTEÍNAS	17
1.3.1 DOMININA	18
1.3.2 SEGON	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 BUSCAS <i>IN SILICO</i>	22
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR <i>IN SILICO</i>	23
3.3 ORGANIZAÇÃO GÊNICA	23
3.4 MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO E SINTENIA	23
3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	24
3.6 MODELAGEM ESTRUTURAL	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 BUSCAS <i>IN SILICO</i> E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	25
4.2 ORGANIZAÇÃO GÊNICA	30
4.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	33
4.4 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL	39
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da anatomia interna de uma ostra, destacando o sistema circulatório semiaberto e os principais órgãos	11
Figura 2 - Microbiota epitelial de uma ostra saudável em comparação a uma ostra doente	13
Figura 3 - Os principais morfotipos de hemócitos identificados na ostra <i>Magallana gigas</i>	14
Figura 4 - Representação esquemática das principais funções de defesa dos hemócitos de ostras	16
Figura 5 - Organização dos genes codificantes de dominina e segon de diferentes espécies de ostras	31
Figura 6 - Localização cromossômica e análise de sintenia dos genes das famílias dominina e segon nos genomas de ostras	32
Figura 7 - Alinhamento múltiplo das proteínas dominina.....	34
Figura 8 - Alinhamento múltiplo da região N-terminal de proteínas segon	35
Figura 9 - Alinhamento múltiplo da região C-terminal das proteínas segon	36
Figura 10 - Alinhamento múltiplo das regiões homólogas de dominina e segon	37
Figura 11 - Representação esquemática (em escala) da organização estrutural das proteínas dominina e segon em espécies de ostras	38
Figura 12 - Árvore filogenética de dominina e segon de ostras.....	39
Figura 13 - Modelagem estrutural das proteínas dominina e segon.....	41
Figura 14 - Alinhamento múltiplo dos domínios Cu/Zn-SOD das proteínas dominina e segon com uma proteína Cu/Zn-SOD citosólica de <i>Magallana gigas</i> (Mg-cyto-SOD)	42
Figura 15 - Modelo proposto para a evolução dos genes dominina e segon em ostras	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências nucleotídicas homólogas à proteína dominina (GenBank: AB269930) e à proteína segon (GenBank: JQ235755) de <i>Crassostrea virginica</i> em espécies ostras	26
Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos de todas as sequências obtidas de dominina...	27
Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos de todas as sequências obtidas de segon	29

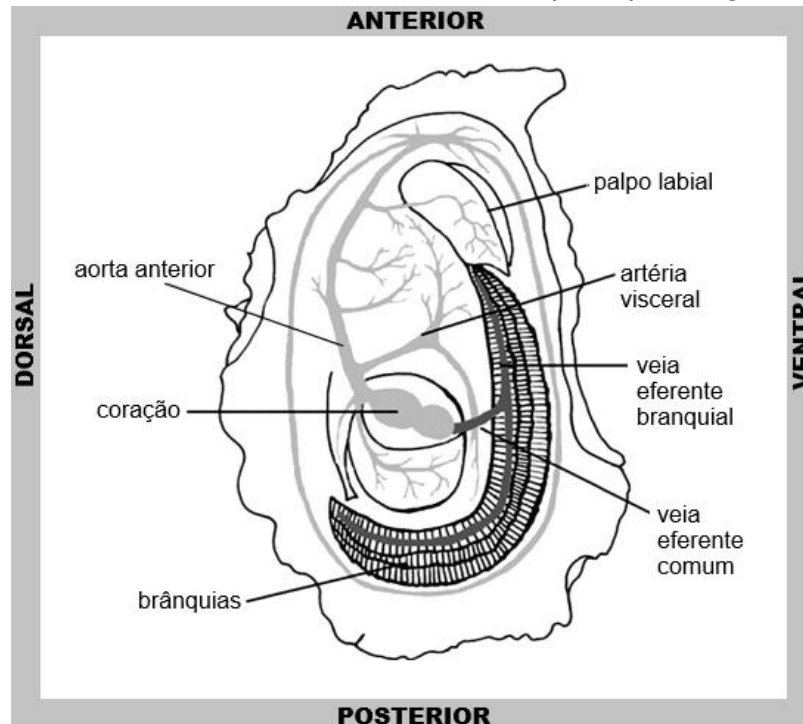
1 INTRODUÇÃO

As ostras são moluscos bivalves pertencentes à família Ostreidae (Mollusca, Bivalvia), que compreende quatro subfamílias: Crassostreinae, Ostreinae, Saccostreinae e Striostreinae. Os ostreídeos possuem uma alta plasticidade morfológica e muitas espécies crípticas (morfologicamente semelhantes). Por essa razão, a taxonomia baseada exclusivamente em características morfológicas tem sido progressivamente substituída ou complementada por análises moleculares, as quais têm promovido novas mudanças na organização de alguns táxons. Uma dessas mudanças ocorreu no gênero *Crassostrea*, que foi recentemente dividido. O nome *Crassostrea* foi mantido para as espécies americanas do Oceano Atlântico, como *C. gasar*, *C. rhizophorae* e *C. virginica*, enquanto que, para as espécies asiáticas do Indo-Pacífico, como *C. ariakensis*, *C. nippona*, *C. hongkongensis* e *C. gigas* foi proposto um novo gênero, *Magallana* (Salvi; Macali; Mariottini, 2014; Salvi; Mariottini, 2016). Atualmente, o gênero *Magallana* é reconhecido pelo banco taxonômico de espécies marinhas *World Register of Marine Species* (WoRMS). Outra mudança de nomenclatura refere-se à espécie nativa brasileira, *Crassostrea gasar*, atualmente reconhecida como *Crassostrea tulipa* pela base taxonômica WoRMS (<https://marinespecies.org/index.php>).

Além da diversidade taxonômica, as ostras também se destacam por manterem uma estreita relação com uma microbiota diversa e dinâmica (Unzueta-Martínez *et al.*, 2022; Unzueta-Martínez; Bowen, 2024). Essa associação é favorecida tanto pelo seu modo de vida filtrador quanto pelo fato de habitarem ambientes costeiros, como zonas entremarés, lagoas e estuários. Esses ambientes, dinâmicos e ricos em microrganismos, influenciam a composição e abundância da comunidade microbiana que interagem com as ostras, à qual elas precisam se adaptar imunologicamente. Outro fator importante para essa associação é o sistema circulatório semiaberto, no qual a hemolinfa (fluido composto por plasma e células) banha diretamente os tecidos conjuntivos. Dessa forma, a hemolinfa promove constante interação entre microrganismos do ambiente e microbiota interna, ao transportar microrganismos e células efectoras (hemócitos) (**Figura 1**). No entanto, apesar de os fatores ambientais possuírem grande influência sobre a microbiota de ostras, as comunidades microbianas associadas a esses holobiontes diferem das comunidades microbianas do ambiente (Diner *et al.*, 2023; Unzueta-Martínez; Bowen, 2024). Isso ocorre porque, além de fatores externos, a própria microbiota exerce funções importantes para a

sobrevivência e homeostase dos ostreídeos, exercendo, portanto, grande influência sobre o sistema imunológico.

Figura 1 - Esquema ilustrativo da anatomia interna de uma ostra, destacando o sistema circulatório semiaberto e os principais órgãos



O sistema circulatório de ostras é composto pelo coração, artérias e veias conectadas a seios hemolinfáticos distribuídos pelo tecido conjuntivo. A hemolinfa passa pelas artérias e banha diretamente os tecidos, posteriormente se reúne em veias e retorna ao coração, após oxigenação por difusão nas brânquias. Adaptado de (Bachère *et al.*, 2004). Tradução própria.

A coexistência entre microbiota e sistema imune é possibilitada por adaptações mútuas. Do lado do hospedeiro, observa-se que as ostras, ao contrário de outros invertebrados, não apresentam uma resposta imunológica essencialmente sistêmica, mas principalmente local (Bachère *et al.*, 2015). A resposta local evita uma resposta generalizada que poderia prejudicar a comunidade bacteriana benéfica. Por outro lado, as comunidades microbianas residentes também influenciam ativamente a eficácia do sistema imunológico (Montagnani *et al.*, 2024). Assim como o sistema imunológico modula a microbiota, esta, por sua vez, modula as células efectoras, ao desempenhar um papel de “educadora”. O termo “educação microbiana” consiste na exposição contínua a antígenos bacterianos, que treina as células efectoras a reconhecer quais são os microrganismos importantes para homeostase e distinguir quais devem ser eliminados. Essa educação permite às células efectoras modularem

os microrganismos de forma dinâmica, evitando a dominância de patógenos. A educação inicia no estágio larval e persiste ao longo da vida, visto que as bactérias estão presentes em todos os estágios de vida da ostra (Unzueta-Martínez *et al.*, 2022). Além da educação, a competição entre bactérias e a liberação de bacteriocinas também contribuem para impedir o estabelecimento e proliferação exacerbada de possíveis patógenos. A modulação recíproca resulta em uma comunidade variável e dinâmica composta por bactérias residentes e transitórias (Liu *et al.*, 2024; Unzueta-Martínez; Bowen, 2024). Contudo, alterações ambientais ou falhas na resposta imune podem favorecer a proliferação de oportunistas e patógenos, levando a um estado de disbiose.

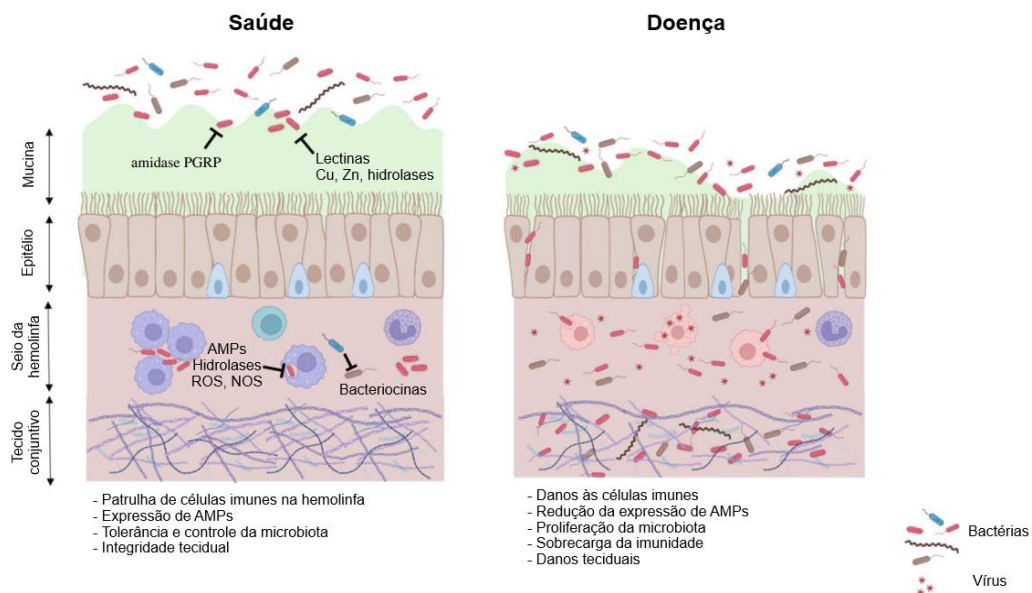
Em um cenário de disbiose, o sistema imune perde o controle sobre sua microbiota, podendo resultar na mortalidade do organismo (**Figura 2**). Para evitar esse desequilíbrio, é essencial que as ostras tenham diversos mecanismos discriminatórios para diferenciar microrganismos benéficos daqueles potencialmente patogênicos (Bachère *et al.*, 2004). Para lidar com os microrganismos, os invertebrados dependem somente da sua imunidade inata, ao contrário dos vertebrados, que também contam com imunidade adaptativa (Netea *et al.*, 2019). O sistema imunológico inato é caracterizado por reconhecer estruturas comuns e conservadas entre os microrganismos e por não possuir memória imunológica. No entanto, estudos recentes descrevem um fenômeno semelhante à memória imune e a uma certa especificidade, conhecido como preparo imunológico (*immune priming*). O preparo imunológico consiste em uma resposta mais rápida e específica após uma segunda exposição ao mesmo patógeno (Zhang *et al.*, 2014). Essa resposta mais rápida e específica se deve ao aumento no número de moléculas imunológicas e à maior proliferação de hemócitos.

1.1 HEMÓCITOS

Os hemócitos são células imunocompetentes que compõem o componente celular da hemolinfa dos moluscos bivalves. Essas células são responsáveis pelo reconhecimento, fagocitose, produção e secreção de fatores de defesa, além da eliminação de agentes invasores. Também participam de processos fisiológicos, como cicatrização de feridas, transporte e digestão de nutrientes, formação da concha e reprodução (de la Ballina *et al.*, 2022; Franchini; Ottaviani, 2000; Mount *et al.*, 2004). Devido à sua importância para homeostase e defesa imunológica, os hemócitos estão

presentes em todos os tecidos, pois o sistema circulatório semiaberto dos moluscos bivalves permite sua infiltração nos tecidos conjuntivos. Os hemócitos são os principais protagonistas da defesa imunológica dos moluscos, embora não atuem isoladamente. Tanto os hemócitos quanto as células epiteliais produzem e secretam diversas substâncias relacionadas à defesa imune, como receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs), hidrolases, proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMPs).

Figura 2 - Microbiota epitelial de uma ostra saudável em comparação a uma ostra doente

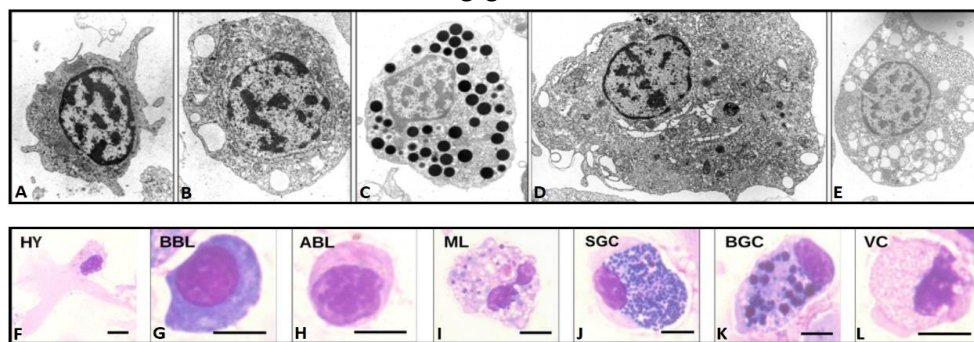


O painel esquerdo representa um cenário de homeostase, no qual o sistema imunológico da ostra controla a microbiota e a mantém afastada das células epiteliais (células marrons) por meio de lectinas, hidrolases, cobre (Cu) e zinco (Zn) e de uma camada de muco (verde) secretada por mucócitos (células azuis). Bactérias circulam na hemolinfa, sem ativar uma resposta imune mensurável. Elas criam um ambiente competitivo e contribuem para a homeostase por meio da secreção de bacteriocinas. Os hemócitos (células roxas) são capazes de modular essa microbiota. O painel direito ilustra um cenário de disbiose, no qual a resposta imune da ostra é comprometida, resultando na redução da expressão de fatores imunológicos e na perda do controle da microbiota. O aumento descontrolado da carga microbiana favorece a invasão bacteriana nos tecidos internos, causando danos às células e sobrecarga do sistema de defesa. ROS: espécies reativas de oxigênio; NOS: espécies reativas de nitrogênio; AMPs: proteínas e peptídeos antimicrobianos. Adaptado de (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2024). Tradução própria.

Apesar da relevância dos hemócitos, ainda não há uma definição clara na literatura e pouco se sabe sobre o processo de hematopoiese e sobre seu local de origem em ostras. Os hemócitos exibem diversos tipos celulares entre as espécies de ostras, mas existe uma classificação amplamente aceita que os agrupa em três tipos principais: hialinócitos, granulócitos e células semelhantes a blastos ou do tipo

blásticas (*blast-like cells*) (de la Ballina *et al.*, 2022) (**Figura 3**). As células do tipo blásticas são células agranulares, pequenas, possuem uma alta razão núcleo/citoplasma e baixa atividade biológica, sugerindo serem células precursoras. Os hialinócitos e granulócitos, por outro lado, são células maiores, diferenciando-se principalmente pela quantidade de grânulos citoplasmáticos. Os hialinócitos possuem poucos ou nenhum grânulo (células agranulares), enquanto os granulócitos são caracterizados pela abundância de grânulos citoplasmáticos e a menor razão núcleo/citoplasma entre os três tipos. Entre as células agranulares e granulares, há diversos subtipos de hemócitos que apresentam morfotipos e funções imunológicas distintas.

Figura 3 - Os principais morfotipos de hemócitos identificados na ostra *Magallana gigas*



Microscopia eletrônica de transmissão mostrando os 3 tipos de hemócitos da classificação clássica (A-E). (A) provável hemócito jovem (blasto); (B) hialinócito; (C) hialinócito com citoplasma rico em cisternas membranosas e lamelas; (D e E) hemócitos granulares contendo grânulos. Adaptado de Bachère *et al.*, 2004. Microscopia óptica dos sete morfotipos de hemócitos (F-L). HY: hialinócito, ML: célula semelhante a macrófago, BBL: célula blastoide basofílica, ABL: célula blastoide acidofílica, SGC: célula com pequenos grânulos, BGC: célula com grandes grânulos, VC: célula vesicular. Adaptado de (De La Forest Divonne *et al.*, 2025).

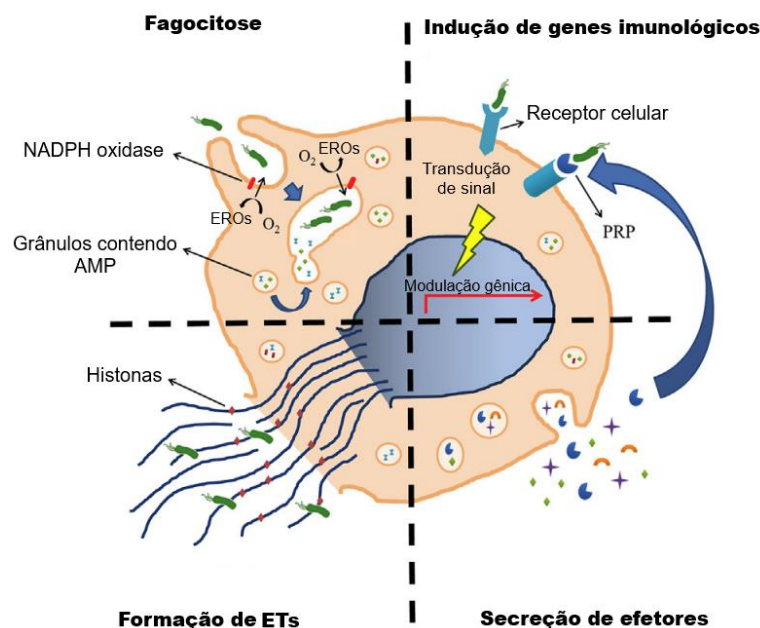
Mais recentemente, na espécie *M. gigas*, foram descritos sete morfotipos de hemócitos: três agranulares (hialinócitos, blastos basofílicos e blastos acidofílicos) e quatro granulares (células semelhantes a macrófagos, células com pequenos grânulos, células com grandes grânulos e células vesiculares) (De La Forest Divonne *et al.*, 2025) (**Figura 3**). Cada subtipo apresenta uma função imunológica específica. Por exemplo, os fagócitos profissionais são as células semelhantes a macrófagos e as células com pequenos grânulos. Além disso, as células com pequenos grânulos também são responsáveis pela homeostase do cobre, enquanto as células semelhantes a macrófagos estão associadas principalmente ao estresse oxidativo. Os hialinócitos são células encarregadas da produção de peptídeos antimicrobianos. Em

relação à via de diferenciação, foi proposto um modelo em que as células vesiculares seriam as células quiescentes e imaturas, capazes de originar os demais tipos celulares. No entanto, apesar dessas descobertas, ainda são necessários mais estudos para compreender plenamente as funções imunológicas de cada subpopulação e os processos de hematopoiese e diferenciação celular dos hemócitos em ostras. Entre os componentes secretados pelos hemócitos, destacam-se os AMPs por sua importância na defesa inata de invertebrados.

1.2 PRINCIPAIS RESPOSTAS DE DEFESA DE OSTRAS

De modo geral, a imunidade inata é iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos/patógenos (M/PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Janeway; Medzhitov, 2002). Esse reconhecimento é feito pelas PRPs (proteínas de reconhecimento de padrões moleculares). Os M/PAMPs são moléculas exógenas, oriundas dos microrganismos, capazes de ativar resposta imunológica. Os mais conhecidos incluem os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, o peptidoglicano (PG) e os ácidos lipoteicóicos (LTA) de bactérias Gram-positivas, β -1,3-glucanos de fungos e os ácidos nucleicos virais. Exemplos de PRPs clássicas de bivalves são as lectinas. As lectinas compreendem uma superfamília amplamente distribuída entre os seres vivos que reconhecem carboidratos específicos da superfície microbiana (Goldstein; Hayes, 1978). O reconhecimento do não-próprio ou de sinais de injúria desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que regula a expressão de diversos genes envolvidos na resposta de defesa (**Figura 4**). Esse reconhecimento pode ocorrer de duas formas: diretamente, por meio de receptores de membrana presentes nos hemócitos, ou indiretamente, por meio de PRPs solúveis encontradas no plasma, fluido extrapalial e muco (Allam; Raftos, 2015). A regulação de genes imunológicos pode ativar a migração de hemócitos para o local da injúria ou infecção, em um processo denominado quimiotaxia (Cheng; Howland, 1979). Além de induzir a produção de moléculas de defesa, o reconhecimento ativa mecanismos efetores, como a fagocitose. Algumas PRPs, como as lectinas, podem atuar adicionalmente como opsoninas, promovendo o reconhecimento de patógenos e facilitando a sua fagocitose pelos hemócitos.

Figura 4 - Representação esquemática das principais funções de defesa dos hemócitos de ostras



Fagocitose: o hemócito internaliza o microrganismo e forma o fagossomo, dentro do fagossomo, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a liberação de fatores imunológicos, como peptídeos antimicrobianos (AMPs) e hidrolases, oriundas da fusão de grânulos citoplasmáticos e lisossomos. Formação de ETs: em resposta a patógenos e/ou danos teciduais, o hemócito libera sua cromatina, que está associada a histonas e AMPs, criando redes extracelulares de DNA que aprisionam e eliminam os invasores. Indução de genes imunológicos: o reconhecimento de patógenos ou sinais de estresse ativa receptores celulares e proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs), desencadeando cascatas de sinalização que modulam a expressão de genes envolvidos na resposta imune. Secreção de efetores: fatores imunológicos são armazenados em grânulos citoplasmáticos e liberados no meio extracelular. Adaptado de (Bachère *et al.*, 2015). Tradução própria.

Uma vez reconhecido pelo hospedeiro, o invasor pode ser internalizado pelo hemócito, formando um fagossomo, vesícula onde se inicia diversos eventos intracelulares para neutralização do patógeno. Dentro dessa vesícula, o microrganismo precisa lidar com um ambiente extremamente oxidativo, resultado da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) mediada pela proteína transmembrana NADPH oxidase. Para proteger a célula hospedeira dessas EROs, a superóxido dismutase (SOD) transforma o ânion superóxido (O_2^-), que são altamente reativos e tóxicos, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produto menos citotóxico (McCord; Fridovich, 1969; McCord; Keele; Fridovich, 1971). Posteriormente, o H_2O_2 é degradado em água e oxigênio por peroxidases, como a catalase e a glutational peroxidase (Trevisan *et al.*, 2014). A maturação do fagossomo ocorre por meio de dois processos principais: a fusão com lisossomos (contendo hidrolases ácidas) e a fusão com grânulos citoplasmáticos (contendo efetores imunológicos). Além disso, a

acidificação da vesícula é promovida por bombas de prótons (H^+) que criam, assim, um ambiente favorável para a morte do invasor.

Apesar da eficiência do processo fagocítico, existem microrganismos que conseguem escapar, neutralizar ou subverter os hemócitos. Por exemplo, para escapar da fagocitose, a bactéria *Vibrio aestuarianus* apresenta dois mecanismos: o primeiro consiste na secreção de produtos extracelulares (ECPs) que inibem a capacidade de formação de pseudópodes dos hemócitos; o segundo consiste na indução da superprodução de EROs, promovidas por ECPs, tornando o ambiente altamente citotóxico para as células hospedeiras (Labreuche *et al.*, 2006). Existem também bactérias que conseguem sobreviver intracelularmente, como ocorre com *Vibrio atlanticus* (= *V. splendidus*) LGP32 que manipula e limita a maturação do fagossomo (Duperthuy *et al.*, 2011). Em outras situações, a fagocitose pode falhar ou não ser possível de realizar devido ao tamanho excessivo da partícula ou microrganismo, como ocorre com certos fungos e parasitas. Quando isso acontece, os hemócitos adotam um mecanismo alternativo para conter a ameaça: eles se aglomeram em volta do agente invasor, em um processo denominado encapsulamento (Aladaileh *et al.*, 2007). Durante esse evento, os hemócitos liberam diversas substâncias imunológicas. Esse encapsulamento impede a disseminação do agente estranho e garante a concentração de substâncias citotóxicas sobre ele.

Além da fagocitose e do encapsulamento, outra possível resposta imunológica é a formação de armadilhas extracelulares, por meio de ETose (Poirier *et al.*, 2014). Esse mecanismo consiste na liberação da cromatina para o meio extracelular promovida pela produção de EROs intracelular. A cromatina funciona como uma armadilha extracelular chamada de ETs (*Extracellular Traps*). Os patógenos ficam aprisionados e sofrem a ação antimicrobiana de histonas associadas ao DNA. As histonas, amplamente conhecidas pelo seu papel na formação da cromatina e na regulação gênica, são importantes antimicrobianos que atuam sobre bactérias, fungos, vírus e protozoários (Poirier *et al.*, 2014). Além das histonas, AMPs associados à cromatina contribuem para a eliminação de microrganismos.

1.3 HEMOLINFA E SUAS PRINCIPAIS PROTEÍNAS

A hemolinfa apresenta um papel central na homeostase, visto que é responsável por fornecer não somente nutrientes e oxigênio, mas também proteínas envolvidas na defesa imunológica e células efetoras. É nesse fluido que o sistema imune das ostras

coexiste com microrganismos resistentes e transitórios (Liu *et al.*, 2024; Unzueta-Martínez; Bowen, 2024). Entre as proteínas com que os microrganismos convivem na hemolinfa, destacam-se as proteínas mais abundantes do plasma, haja vista que a comunidade microbiana mantém contato constante com elevadas concentrações dessas proteínas. Nos ostreídeos, as duas proteínas plasmáticas mais abundantes correspondem a aproximadamente 70% das proteínas totais do plasma (Xue; Beguel; La Peyre, 2019). Dessa porcentagem, cerca de 50% é representado pela proteína majoritária (dominina), enquanto o restante (cerca de 20%) corresponde à segunda mais abundante (segona). Considerando a alta concentração das duas principais proteínas do plasma, é possível inferir que tenham funções biológicas vitais para a família Ostreidae, sobretudo funções imunológicas.

1.3.1 Dominina

A proteína plasmática majoritária de ostras é conhecida por diversos nomes na literatura: Scotti *et al.*, (2001) e Gonzalez *et al.*, (2005) a identificaram, respectivamente, como cavortina e superóxido dismutase extracelular (Cg-EcSOD) na espécie *M. gigas*, enquanto que Itoh *et al.*, (2011) e Trevisan *et al.*, (2017) a nomearam de dominina em *C. virginica* e *C. tulipa*, respectivamente. Em *Saccostrea glomerata* a proteína também foi designada como superóxido dismutase extracelular Sg-EcSOD (Green *et al.*, 2009). Para melhor fluidez, o presente estudo utilizará a nomenclatura “dominina” para se referir à principal proteína plasmática de ostras. Apesar das distintas nomenclaturas, as domininas compartilham características moleculares similares e, presumivelmente, funções biológicas parecidas.

As domininas são proteínas aniônicas expressas pelos hemócitos, com ponto isoelétrico teórico entre 4,7 e 5,18, e uma massa molecular estimada entre 19,2 e 19,7 kDa (Gonzalez *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2011; Scotti; Dearing; Greenwood, 2007). São proteínas glicosiladas e possuem resíduos de cisteínas que formam ligações dissulfeto intramoleculares, o que altera sua mobilidade em géis de eletroforese sob condições redutoras (Green *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2011; Scotti; Dearing; Greenwood, 2007; Trevisan *et al.*, 2017). (Gonzalez *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2016; Trevisan *et al.*, 2017). Uma característica marcante das domininas é a presença de um domínio presente em proteínas cobre, zinco superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD). No entanto, está bem estabelecido que esse domínio não tem atividade típica

de superóxido dismutase devido à ausência de resíduos catalíticos essenciais (Green *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2011; Scotti; Dearing; Greenwood, 2007).

Quanto à sua função, a dominina apresenta potencial para atuar como uma proteína de reconhecimento de padrão (PRP) e como uma opsonina, uma vez que, em espécies como *M. gigas*, *C. virginica* e *C. tulipa*, essas proteínas exibem motivos de ligação ao LPS e à integrina. As domininas possuem ainda capacidade de ligação a cátions divalentes, como zinco, cobre e, especialmente, ferro (Scotti; Dearing; Greenwood, 2007). Consequentemente, suas funções têm sido associadas ao transporte, sequestro e biotransformação de metais (Itoh *et al.*, 2011; Scotti; Dearing; Greenwood, 2007). A capacidade de ligação ao ferro pode também ser importante na defesa ao limitar a disponibilidade desse metal para microrganismos (Itoh *et al.*, 2011). Em suma, é evidente que as domininas desempenham um papel crítico na defesa, visto que estão envolvidas na resistência a doenças, apresentam regulação positiva após desafio com bactérias ou protozoários e demonstram uma possível atividade antiviral (Green *et al.*, 2009, 2014; Huvet *et al.*, 2004; Tanguy; Guo; Ford, 2004; Taris *et al.*, 2009).

1.3.2 Segon

A segunda proteína mais abundante do plasma de ostras foi inicialmente descrita em *C. virginica* e denominada segon, que significa “segundo(a)” em catalão (Xue *et al.*, 2012). Assim como a dominina, a segon é uma proteína glicosilada, expressa pelos hemócitos e com caráter aniônico, com um ponto isoelétrico teórico de 5,91. Notou-se que a segon de *S. glomerata* apresenta resíduos de cisteína que formam ligações dissulfeto intramoleculares, as quais modificam sua mobilidade em géis de eletroforese sob condições redutoras (Green *et al.*, 2009). De modo semelhante à dominina, acredita-se que a função da segon esteja relacionada às suas propriedades de ligação a metais (Xue *et al.*, 2012). Adicionalmente, a segon e a dominina possivelmente atuam em conjunto na formação da concha, uma vez que ambas formam complexos multiproteicos, apresentam expressão aumentada após danos na concha e são mais abundantes em indivíduos jovens e no muco palial (Pales Espinosa; Allam, 2021; Xue; Beguel; La Peyre, 2019).

Apesar da alta abundância da dominina e da segon, que juntas correspondem a aproximadamente 70% das proteínas totais do plasma (Xue; Beguel; La Peyre, 2019), o conhecimento disponível sobre sua estrutura e funções biológicas ainda é limitado

e, em grande parte, especulativo. A segon, em particular, apresenta uma lacuna de conhecimento muito maior, sendo caracterizada até o momento apenas em uma espécie (*C. virginica*). Diante disso, a caracterização molecular e funcional dessas famílias proteicas em diferentes espécies de ostras é fundamental, não apenas para a compreensão real dos seus papéis fisiológicos, como também para entender como variações nessas proteínas podem alterar a função e contribuir para adaptações específicas. As poucas informações disponíveis sobre dominina e segon sugerem funções fisiológicas e de defesa, o que evidencia a necessidade de aprofundar os estudos sobre essas moléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade molecular e inferir as relações evolutivas das principais proteínas plasmáticas de ostras, com ênfase em dominina e segon.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a prospecção *in silico* de sequências codificantes das proteínas dominina e segon em ostras;
- Caracterizar molecularmente *in silico* as sequências obtidas;
- Determinar a organização gênica e o mapeamento cromossômico dos genes dominina e segon;
- Definir as relações filogenéticas entre as proteínas dominina e segon.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BUSCAS *IN SILICO*

Para a prospecção de novas sequências codificantes de dominina e segon, foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) as sequências nucleotídicas e aminoacídicas deduzidas da dominina (GenBank: AB269930) e segon (GenBank: JQ235755) da ostra *C. virginica*. As buscas foram conduzidas no repositório público *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando as ferramentas BLASTx e tBLASTx. A prospecção foi realizada em bancos de dados anotados (*Nucleotide and Protein Collection*) e não anotados (*Expressed Sequence Tags* e *Transcriptome Shotgun Assembly*). Inicialmente, as buscas restringiram-se à família Ostreidae. Em seguida, a busca foi ampliada para o filo Mollusca, excluindo-se Ostreidae. Essa limitação nas buscas teve como objetivo identificar sequências somente em ostras, bem como sequências similares em outros grupos de moluscos. Foram desconsideradas sequências com identidade inferior a 60% e com coeficiente de confiabilidade (*e-value*) superior a 10^{-5} .

Também foram realizadas buscas por sequências codificantes de dominina e segon nos genomas de ostras disponíveis no NCBI, utilizando a ferramenta BLASTn. Para isso, utilizaram-se como sequências de entrada as sequências de dominina e segon obtidas na etapa anterior. No caso das espécies para as quais não foram encontradas sequências em bancos anotados e não anotados, utilizaram-se sequências de entrada de outras espécies já identificadas. A sequência que demonstrou maior cobertura e identidade foi selecionada para definir os éxons e íntrons no genoma de cada espécie. O banco de dados resultante desta etapa foi nomeado "genoma", pois consiste em sequências não anotadas identificadas nos respectivos genomas. Todas as sequências obtidas foram conferidas manualmente e os íntrons das sequências encontradas no banco "genoma" foram removidos.

As regiões codificantes foram traduzidas por meio da ferramenta *ExPASy Translate Tool* (<http://web.expasy.org/translate/>). Apenas sequências completas que atenderam aos critérios estabelecidos foram incluídas nas análises subsequentes. As sequências aminoacídicas deduzidas da dominina e da segon foram alinhadas com a ferramenta MAFFT 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) para a identificação de resíduos conservados. Adicionalmente, para visualizar resíduos

conservados ou não do sítio ativo do domínio Cu/Zn-SOD, foram realizados alinhamentos no Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) utilizando a proteína Cu/Zn SOD citosólica de *M. gigas* (GenBank: XM_034479061). Neste trabalho, essa sequência foi referida como *Mg-cyto-SOD*.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR *IN SILICO*

Para a identificação do peptídeo sinal nas sequências aminoacídicas deduzidas, foi utilizado o programa SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>). Posteriormente, os parâmetros bioquímicos, incluindo o ponto isoelétrico teórico (pI) e massa molecular (MM) da proteína madura, foram estimados com a ferramenta *ExPASy ProtParam Tool* (<http://web.expasy.org/protparam/>). A predição de domínios proteicos conservados foi conduzida por meio da ferramenta *Conserved Domain Database* (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

3.3 ORGANIZAÇÃO GÊNICA

A organização dos genes de *dominina* e *segon* foi determinada nos genomas de *Ostreidae* disponíveis no repositório GenBank (NCBI). As buscas *in silico* no genoma de ostras tiveram como objetivo não somente identificar novas sequências codificantes, mas também determinar a organização dos genes não anotados. Para identificar a estrutura gênica de cada sequência, incluindo o número de éxons e íntrons, realizou-se um alinhamento entre a sequência de entrada (cDNA) e a respectiva sequência de DNA genômico (gDNA). Esse procedimento não foi necessário para os genes anotados, visto que suas regiões de éxons e íntrons já se encontravam definidas. Posteriormente, as estruturas gênicas foram representadas graficamente por meio da ferramenta GSDS 2.0 (<https://gsds.gao-lab.org/?utm>).

3.4 MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO E SINTENIA

A localização cromossômica, o número de cópias gênicas e as relações de sintenia dos genes *dominina* e *segon* foram determinados nos genomas de *Ostreidae* disponíveis no NCBI, por meio de buscas BLASTn. As análises de sintenia entre as espécies foram conduzidas pelo método MCscanX e visualizadas com TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools-II?tab=readme-ov-file>). O mapeamento cromossômico foi realizado somente em sete espécies de ostras que possuem

genoma em nível cromossômico, enquanto as análises de sintenia restringiram-se às quatro espécies (*C. virginica*, *M. angulata*, *M. gigas* e *O. edulis*), pois estas possuíam genomas em nível cromossômico e anotados. Os genomas de referência utilizados nas análises foram: *C. virginica* (C_virginica-3.0, GCA_002022765.4); *M. ariakensis* (ASM2045803v1; GCA_020458035.1); *M. angulata* (ASM2561291v2, GCA_025612915.2); *M. gigas* (cgigas_uk_roslin_v1, GCA_902806645.1); *M. hongkongensis* (ASM1577677v1, GCA_015776775.1); *M. nippona* (Cni_ZS_v1, GCA_033439105.1); *O. edulis* (xbOstEdu1.1, GCA_947568905.1).

3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A construção de cladograma foi realizada por meio do software MEGA 12 (<https://www.megasoftware.net/>). Para isso, as sequências codificantes (CDS) das proteínas dominina e segon foram alinhadas por meio da ferramenta MAFFT 7. A árvore filogenética foi obtida pelo método estatístico de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) com 1.000 replicatas, considerando apenas as primeiras posições dos códons. Para estimar a divergência entre as sequências nucleotídicas, o *dataset* obtido foi submetido à predição do melhor modelo de substituição de nucleotídeos. O modelo selecionado foi o Tamura-Nei (TN93), com distribuição Gama (G) e fração de sítios invariantes (I). Dessa forma, a reconstrução filogenética foi realizada com este modelo (TN93+G+I), no qual as diferenças nas taxas evolutivas entre os sítios foram modeladas usando uma distribuição Gama (G) discreta em cinco categorias e 16,25% dos sítios foram considerados evolutivamente invariantes (I).

3.6 MODELAGEM ESTRUTURAL

As estruturas tridimensionais das proteínas dominina e segon de *Crassostrea virginica* (GenBank: AB269930; JQ235755) e *Magallana gigas* (GenBank: AY551094; MT793719) foram preditas por meio da plataforma ColabFold v1.5.5 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>), a qual implementa o algoritmo AlphaFold2 e gera cinco modelos para cada proteína. Dentre estes, foi selecionado como modelo final aquele com a maior pontuação média de pLDDT (*Predicted Local Distance Difference Test*). Por fim, o software PyMol (<https://www.pymol.org/>) foi utilizado para visualização, análise estrutural e geração das figuras dos modelos preditos.

4 RESULTADOS

4.1 BUSCAS *IN SILICO* E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As buscas *in silico* resultaram na identificação de 100 sequências nucleotídicas semelhantes a proteína dominina (14 espécies de ostras) e 30 a proteína segon (13 espécies), respectivamente (**Tabela 1**). Sequências de dominina foram encontradas em todas as 14 espécies, mas as de segon foram identificadas em apenas 13. No entanto, a segon de *Crassostrea rhizophorae* e de *Ostrea lurida* não foram incluídas neste estudo, uma vez que a baixa qualidade dos sequenciamentos genômicos disponíveis impossibilitou a determinação correta de seus éxons, apesar da identificação de uma única sequência em cada espécie.

Em relação aos bancos de dados, para a dominina, a maioria das sequências foi obtida de bancos de dados não anotados (36 de EST; 29 de TSA; 19 de Core Nucleotide e 16 de genomas). Em contraste, nenhuma sequência de segon foi encontrada em bancos EST, sendo estas obtidas de Core Nucleotide (n=12), TSA (n=12) e de genomas (n=6). Em *Saccostrea echinata*, as três únicas segon identificadas são preditas pelo GenBank como isoformas da mesma proteína. Durante a prospecção de sequências, verificou-se que a única sequência de segon anotada para a ostra *Saccostrea cucullata* no GenBank (XM_062751473) era uma predição quimérica. A anotação original descreve um único gene de 15 éxons, separados por um íntron extenso (~5 kb) entre os éxons 9 e 10. No entanto, a conferência manual da estrutura gênica revelou que, na verdade, os éxons 1 a 9 correspondem ao gene completo da segon. A predição incorreta foi confirmada ao notar que a adição de 17 nucleotídeos ao final do éxon 9 resultou em um códon de parada. Os éxons 10 a 15 correspondem a um gene completo da dominina, localizado a jusante do gene segon. Dessa forma, o gene XM_062751473 foi desconsiderado dos resultados. As sequências corretas foram manualmente extraídas do *scaffold* NW_026918657.1, sendo o gene dominina NW_026918657 (48970.. 53548) e o gene segon NW_026918657 (40755.. 44540).

Adicionalmente, a busca por proteínas homólogas em outros moluscos indicou que a segon é exclusiva da família Ostreidae, enquanto uma sequência semelhante à dominina, a pernina (AF273766), foi também descrita no mexilhão *Perna canaliculus* (Scotti *et al.*, 2001).

Tabela 1 - Sequências nucleotídicas homólogas à proteína dominina (GenBank: AB269930) e à proteína segon (GenBank: JQ235755) de *Crassostrea virginica* em espécies ostras

DOMININA	
Espécie	ID GenBank
<i>C. virginica</i>	■ AB269930; XM_022451521; XM_022451522; XM_022451523; XM_022452581 ■ GHJJ01027332; GGQE01112218; GHJJ01027331; GGQE01112219 ■ CD648621; CD649188; CD649071; CD648998; CD648295; CD647088; CD650428; CD647697; CD647705; CD648763; CD648155; CD648443; CD648647; CD649186; CV132403; CV088159; CV132736; CD649879; CD648076
<i>C. rhizophorae</i>	■ JBEOLP010000055 (565980..568647); JBEOLP010000055 (592406..595130)
<i>C. tulipa</i>	■ KU710254 ■ GJZE01007558; GJZE01006039; GJZE01007336
<i>M. angulata</i>	■ XM_052826792; XM_052826790; XM_052826789 ■ GGIZ01021082; GGIZ01009101
<i>M. ariakensis</i>	■ CM035820 (2877298..2880034); CM035820 (2886346..2889247); CM035820 (2868410..2871141); CM035820 (2856518..2859068)
<i>M. gigas</i>	■ XM_011416093; NM_001308888; AY551094; DQ010420; XM_011441495 ■ GJKF01136588; GGEL01090189; GGEL01046575; GJKF01136587; GJKF01136593; GIUV01014531; GECI01016842; GGEL01019589; GGEL01019587 ■ CU999489; HS248491; HS223947; HS209506; CU998438; FP009892; FP005746; EW778149; FP006319; FP001082; FP009968; FP006468; FP002987; AJ565657; FP001846; CU994592; FP006093
<i>M. hongkongensis</i>	■ KJ741847 ■ GGKN01097070 ■ CM027467 (50690840..50693263); CM027467 (50720505..50723152); CM027467 (50704246..50709105)
<i>M. nippona</i>	■ CM065924 complement(3955546..3957799); CM065924 complement(3962022..3964687); CM065924 complement(3969653..3972392)
<i>O. denselamellosa</i>	■ JAMZEH010000065 complement(6556246..6560639);
<i>O. edulis</i>	■ XM_048900234
<i>O. lurida</i>	■ CAJDSM010001348 complement(12022..16496)
<i>S. cucullata</i>	■ XM_062751482 ■ NW_026918657 (48970.. 53548)
<i>S. echinata</i>	■ XM_061324005
<i>S. glomerata</i>	■ FJ626709 ■ PRKT01000576 complement(212896..217444) ■ GBJD01024595; GBJD01025447; GBJD01018060; GGZL01069615; GGZL01069614; GBJD01022682; GGIC01473813; GBJD01024314; GGZM01047308; GBJD01023453
SECON	
Espécie	ID GenBank
<i>C. virginica</i>	■ JQ235755; XM_022454743; XM_022454455 ■ GGQE01116120; GHJJ01048536; GJUX01022817; GJUX01022816
<i>C. tulipa</i>	■ KU710253 ■ GJZE01000736
<i>M. angulata</i>	■ XM_052828108 ■ GGIZ01005112
<i>M. ariakensis</i>	■ CM035820 complement(2836987..2843430)
<i>M. gigas</i>	■ MT793719; XM_011416094 ■ GJKF01136594; GECI01010161
<i>M. hongkongensis</i>	■ CM027467 complement(50676970..50684199) ■ GGKN01007162
<i>M. nippona</i>	■ CM065924 (3977310..3984305) ■ GGUV02041482
<i>O. denselamellosa</i>	■ JAMZEH010000065 (6571129..6576491)
<i>O. edulis</i>	■ XM_048900231; GU320696
<i>S. cucullata</i>	■ NW_026918657 (40755.. 44540)
<i>S. echinata</i>	■ XM_061324007; XM_061324008; XM_061324009
<i>S. glomerata</i>	■ PRKT01000576 (181577..185038) ■ GGZL01069616
<i>Saccostrea</i> sp.	■ GGZM01047307

As cores dos quadrados representam as bases de dados do GenBank: ciano = Core Nucleotide; cinza = EST (Expressed sequence Tags); preto = TSA (Transcriptome Shotgun Assembly); vermelho = Genoma.

A caracterização molecular realizada com as 100 sequências de dominina revelou alta conservação entre as 14 espécies. As sequências apresentaram um peptídeo sinal (PS) de 16 a 19 resíduos, seguido de uma proteína madura de 173 a 179 resíduos. A massa molecular predita (MM) apresentou variação mínima entre 18,92 e 19,75 kDa (**Tabela 2**). Todas as sequências de dominina foram preditas como aniônicas, com ponto isoelétrico teórico (pI) de 4,84 a 5,67.

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos de todas as sequências obtidas de dominina

Espécie	ID GenBank	Precursor	PS	PM	MM (kDa)	pI	PF00080
<i>C. virginica</i>	AB269930	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	XM_022451522	192	18	174	19,35	5,04	47-168
	XM_022451523	192	18	174	19,09	5,17	47-168
	XM_022451521	192	18	174	19,30	5,02	47-168
	XM_022452581	174	18	156	17,56	5,05	47-149
	GHJJ01027332	192	18	174	19,43	5,12	47-168
	GGQE01112218	192	18	174	19,36	5,04	47-168
	GHJJ01027331	192	18	174	19,41	5,04	47-168
	GGQE01112219	192	18	174	19,53	5,05	47-168
	CD648621	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD649188	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD649071	192	18	174	19,37	5,12	47-168
	CD648998	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD648295	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD647088	192	18	174	19,36	5,12	47-168
	CD650428	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD647697	192	18	174	19,37	5,12	47-168
	CD647705	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD648763	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD648155	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD648443	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD648647	192	18	174	19,39	5,12	47-168
	CD649186	192	18	174	19,16	5,1	47-168
	CV132403	190	18	172	19,18	5,18	45-166
	CV088159	192	18	174	19,3	5,09	47-168
	CV132736	192	18	174	19,3	5,02	47-168
	CD649879	192	18	174	19,43	5,05	47-168
	CD648076	192	18	174	19,37	5,04	47-168
<i>C. rhizophorae</i>	JBEOLP010000055 (565980..568647)	191	18	173	19,33	5,18	46-167
	JBEOLP010000055 (592406..595130)	192	18	174	19,37	5,2	47-168
<i>C. tulipa</i>	KU710254	191	18	173	19,21	5,11	46-167
	GJZE01007558	191	18	173	19,28	5,28	46-167
	GJZE01006039	191	18	173	19,21	5,04	46-167
	GJZE01007336	190	18	172	18,92	5,67	45-166
<i>M. angulata</i>	XM_052826792	192	18	174	19,51	5,04	47-168
	XM_052826790	192	18	174	19,4	5,02	47-168
	XM_052826789	192	18	174	19,38	5,1	47-168
	GGIZ01021082	192	18	174	19,38	5,1	47-168
	GGIZ01009101	192	18	174	19,41	5,02	47-168
<i>M. ariakensis</i>	CM035820 (2877298..2880034)	193	19	174	19,46	5,19	47-168
	CM035820 (2886346..2889247)	192	18	174	19,49	5,19	47-168
	CM035820 (2868410..2871141)	194	19	175	19,54	5,12	48-169
	CM035820 (2856518..2859068)	194	19	175	19,56	5,12	48-169
<i>M. gigas</i>	XM_011416093	192	18	174	19,44	4,91	47-168
	NM_001308888	192	18	174	19,51	5,04	47-168
	AY551094	192	18	174	19,57	5,04	47-168
	DQ010420	192	18	174	19,46	4,84	47-168

	XM_011441495	193	19	174	19,44	5,18	47-168
	GJKF01136588	193	19	174	19,44	5,18	47-168
	GGEL01090189	193	19	174	19,44	5,18	47-168
	GGEL01046575	193	19	174	19,51	5,04	47-168
	GJKF01136587	192	18	174	19,54	5,04	47-168
	GJKF01136593	192	18	174	19,44	4,91	47-168
	GIUV01014531	192	18	174	19,46	5,11	47-168
	GECI01016842	192	18	174	19,42	5,03	47-168
	GGEL01019589	192	18	174	19,43	4,91	47-168
	GGEL01019587	192	18	174	19,43	4,91	47-168
	CU999489	192	18	174	19,5	4,98	47-168
	HS248491	192	18	174	19,44	4,91	47-168
	HS223947	192	18	174	19,44	4,91	47-168
	HS209506	192	18	174	19,39	4,91	47-168
	CU998438	192	18	174	19,44	4,91	47-168
	FP009892	192	18	174	19,44	4,91	47-168
	FP005746	192	18	174	19,42	4,91	47-168
	EW778149	192	18	174	19,43	4,91	47-168
	FP006319	190	18	172	19,2	4,85	45-166
	FP001082	192	18	174	19,58	5,12	47-168
	FP009968	192	18	174	19,54	5,04	47-168
	FP006468	192	18	174	19,51	5,04	47-168
	FP002987	192	18	174	19,51	5,04	47-168
	AJ565657	192	18	174	19,5	5,04	47-168
	FP001846	193	19	174	19,44	5,18	47-168
	CU994592	192	18	174	19,51	4,97	47-168
	FP006093	192	18	174	19,53	5,12	47-168
<i>M. hongkongensis</i>	KJ741847	192	18	174	19,45	5,13	47-168
	GGKN01097070	192	18	174	19,37	5,19	47-168
	CM027467 (50690840..50693263)	192	18	174	19,40	5,02	47-168
	CM027467 (50720505..50723152)	192	18	174	19,53	5,03	47-168
	CM027467 (50704246..50709105)	192	18	174	19,45	5,19	47-168
<i>M. nippona</i>	CM065924 complement (3955546..3957799)	192	18	174	19,49	4,98	47-168
	CM065924 complement(3962022..3964687)	192	18	174	19,46	4,98	47-168
	CM065924 complement(3969653..3972392)	192	18	174	19,36	4,95	47-168
<i>O. denselamellosa</i>	JAMZEH010000065 complement (6556246..6560639)	191	18	173	19,37	5,11	45-166
<i>O. edulis</i>	XM_048900234	192	18	174	19,58	5,25	46-167
<i>O. lúrida</i>	CAJDSM010001348 complement (12022..16496)	189	15	174	19,5	5,04	46-167
<i>S. cucullata</i>	XM_062751482	194	16	178	19,65	4,95	51-172
	NW_026918657 (48970.. 53548)	193	16	177	19,51	5,1	50-171
<i>S. echinata</i>	XM_061324005	193	17	176	19,53	5,07	49-170
<i>S. glomerata</i>	FJ626709	195	16	179	19,75	5,27	52-173
	PRKT01000576 complement (212896..217444)	195	16	179	19,73	5,1	52-173
	GBJD01024595	195	16	179	19,8	5,18	52-173
	GBJD01025447	195	16	179	19,73	5,1	52-173
	GBJD01018060	195	16	179	19,73	5,1	52-173
	GGZL01069615	195	16	179	19,73	5,1	52-173
	GGZL01069614	195	16	179	19,72	4,94	52-173
	GBJD01022682	195	16	179	19,73	5,1	52-173
	GGIC01473813	195	16	179	19,72	4,94	52-173
	GBJD01024314	192	16	176	19,47	5,01	49-170
	GGZM01047308	193	17	176	19,53	5,07	49-170
	GBJD01023453	192	16	176	19,47	5,01	49-170

PS = peptídeo sinal (valores em resíduos de aminoácidos); PM = proteína madura (valores em resíduos de aminoácidos); MM = massa molecular predita em kDa; pI = ponto isoelétrico teórico; PF00080 = Domínio da família Cu/Zn-SOD (Superoxide dismutase; SOD; EC 1.15.1.1).

A segon, por outro lado, apresentou maior variabilidade molecular, com peptídeo sinal de 16, 18 ou 20 resíduos, proteína madura de 243 a 417 resíduos e massa molecular variando de 27,27 a 47,68 kDa (**Tabela 3**). As maiores massas moleculares foram observadas em *C. tulipa* e nas espécies do gênero *Magallana*, enquanto *C. virginica* e as espécies do gênero *Ostrea* apresentaram os menores valores. Assim como observado para a dominina, todas as sequências de segon foram preditas como aniônicas, com pI entre 4,88 e 6,28. Embora ambas as famílias sejam aniônicas, as domininas majoritariamente apresentam um pI mais baixo em comparação com a segon.

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos de todas as sequências obtidas de segon

Espécie	ID GenBank	Precursor	PS	PM	MM (kDa)	pI	PF00080
<i>C. virginica</i>	JQ235755	277	16	261	30,48	5,91	-
	XM_022454743	277	16	261	30,5	5,92	-
	XM_022454455	277	16	261	30,49	6,08	-
	GGQE01116120	277	16	261	30,48	5,91	-
	GHJJ01048536	277	16	261	30,48	5,91	-
	GJUX01022817	277	16	261	30,42	6,28	-
	GJUX01022816	278	16	262	30,46	6,12	-
<i>C. tulipa</i>	KU710253	432	18	414	47,38	5,88	286-408
	GJZE01000736	432	18	414	47,38	5,88	286-408
<i>M. angulata</i>	XM_052828108	427	16	411	46,66	5,5	283-405
	GGIZ01005112	427	16	411	46,66	5,55	283-405
<i>M. ariakensis</i>	CM035820 complement (2836987..2843430)	433	16	417	47,68	5,77	289-411
<i>M. gigas</i>	MT793719	427	16	411	46,62	5,55	283-405
	XM_011416094	427	16	411	46,6	5,55	283-405
	GJKF01136594	427	16	411	46,6	5,55	283-405
	GECI01010161	427	16	411	46,65	5,55	283-405
<i>M. hongkongensis</i>	CM027467 complement (50676970..50684199)	427	16	411	46,66	5,55	283-405
	GGKN01007162	433	16	417	47,48	5,96	289-411
<i>M. nippona</i>	CM065924 (3977310..3984305)	431	16	415	47,11	5,58	287-409
	GGUV02041482	431	16	415	47,04	5,59	287-409
<i>O. densamellosa</i>	JAMZEH010000065 (6571129..6576491)	263	20	243	27,29	5,17	112-216
<i>O. edulis</i>	XM_048900231	264	20	244	27,27	4,92	113-235
	GU320696	264	20	244	27,35	4,88	113-235
<i>S. cucullata</i>	NW_026918657 (40755..44540)	357	18	339	38,65	5,57	212-333
<i>S. echinata</i>	XM_061324007	360	18	342	39,27	5,18	215-336
	XM_061324008	360	18	342	39,28	5,18	215-336
	XM_061324009	360	18	342	39,25	5,29	215-336
<i>S. glomerata</i>	PRKT01000576 (181577..185038)	357	18	339	38,68	5,74	212-333
	GGZL01069616	357	18	339	38,61	5,70	212-333
<i>Saccostrea sp.</i>	GGZM01047307	360	18	342	39,26	5,18	215-336

PS = peptídeo sinal (valores em resíduos de aminoácidos); PM = proteína madura (valores em resíduos de aminoácidos); MM = massa molecular predita em kDa; pI = ponto isoelétrico teórico; PF00080 = Domínio da família Cu/Zn-SOD (Superoxide dismutase; SOD; EC 1.15.1.1).

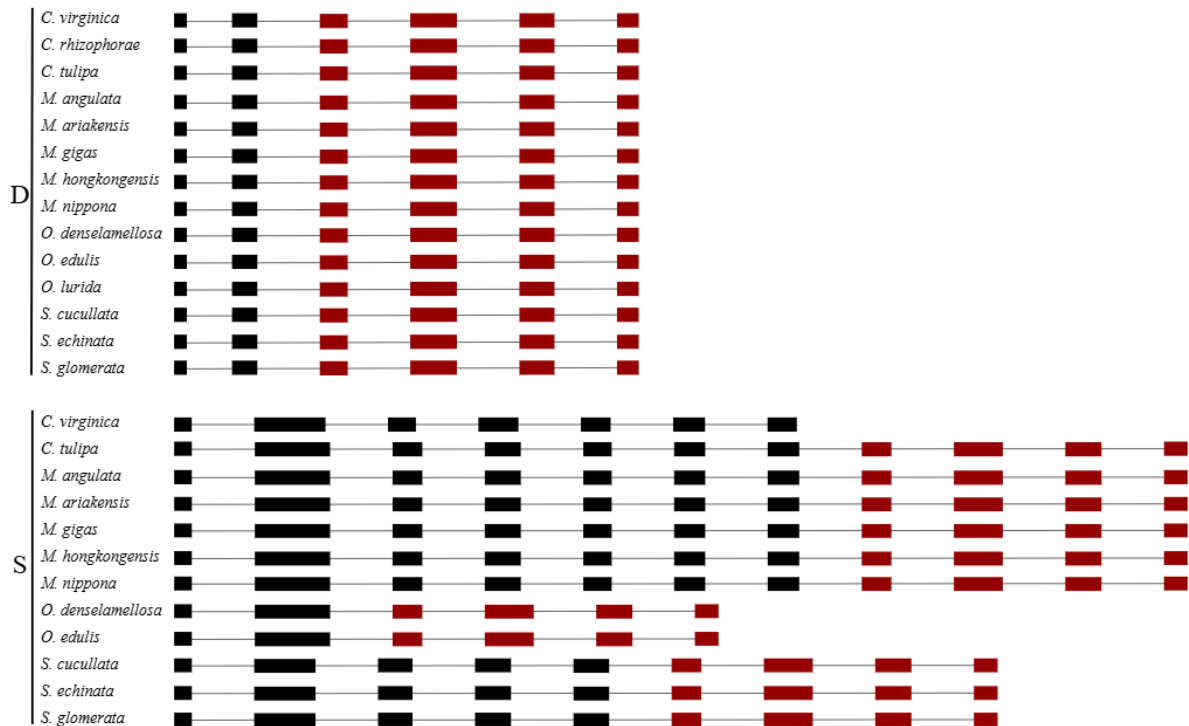
Estruturalmente, tanto a dominina quanto a segon apresentam um único domínio Cu/Zn-SOD (Pfam: PF00080), homólogo à proteína superóxido dismutase (SOD; EC

1.15.1.1). A única exceção é a segon de *C. virginica* (Cv-segon), que não apresenta esse domínio. Esse achado representa uma novidade, pois a Cv-segon era, até o momento, a única segon descrita na literatura e a falta de domínio Cu/Zn-SOD nessa proteína, poderia levar à suposição que essa era uma característica de todas as proteínas segon, no entanto, os dados do presente trabalho demonstram que a ausência desse domínio é uma exceção.

4.2 ORGANIZAÇÃO GÊNICA

A análise da organização gênica revelou padrões distintos entre as duas famílias (**Figura 5**). A dominina apresentou uma organização gênica bastante conservada, com todas as 14 espécies apresentando 6 éxons interrompidos por 5 íntrons. Em contraste, a segon apresentou maior variedade na organização gênica entre as 13 espécies. O número de éxons variou entre os gêneros: 6 éxons (*Ostrea*), 7 éxons (*C. virginica*), 9 éxons (*Saccostrea*) e 11 éxons (*Magallana* e *C. tulipa*). Além disso, a análise da estrutura gênica revelou que os últimos quatro éxons de dominina e de segon são homólogos (exceto para o gene Cv-segon), correspondendo justamente à região que codifica o domínio Cu/Zn-SOD.

Figura 5 - Organização dos genes codificantes de dominina e segon de diferentes espécies de ostras

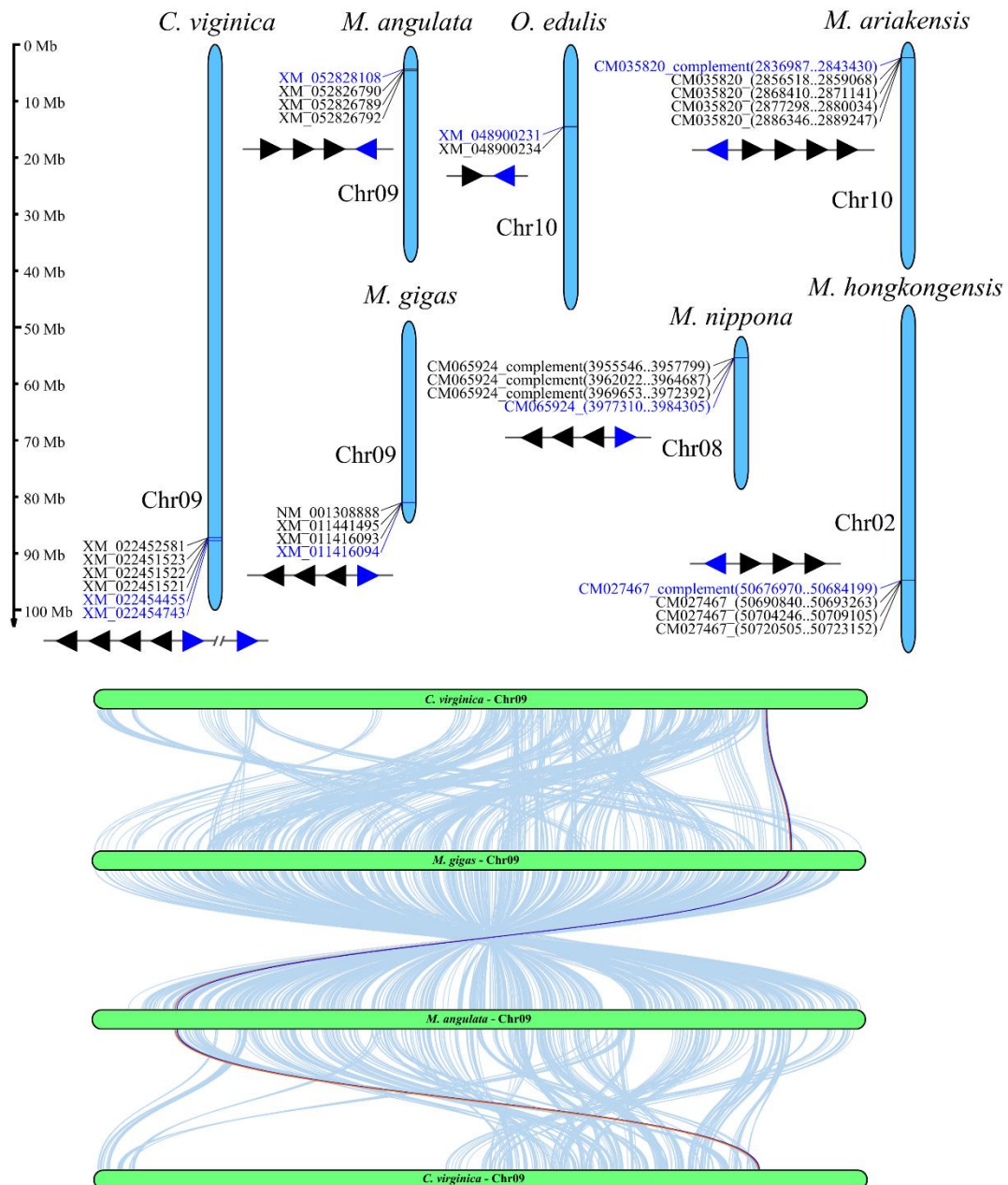


Os retângulos representam as sequências codificantes (CDS), nos quais a cor vermelha destaca os éxons homólogos entre dominina e segon e as linhas finas representam os íntrons. As sequências dos genes codificantes de domininas estão indicadas em “D” e as de segon em “S”. As espécies estão listadas à esquerda. As sequências utilizadas no esquema estão listadas na Tabela A1. Figura sem escala.

Os genes dominina e segon foram mapeados em sete espécies de ostras: *C. virginica*, *M. angulata*, *M. ariakensis*, *M. gigas*, *M. hongkongensis*, *M. nippona* e *O. edulis* (**Figura 6**, painel superior). Em *C. virginica*, o mapeamento identificou um cluster contendo quatro genes dominina e um gene segon (XM_022454455). O segundo gene segon de *C. virginica* (XM_022454743) localiza-se próximo a esse agrupamento, a aproximadamente 380 kb de distância. Em *M. gigas* e *M. angulata*, foi identificado um cluster composto por dois grupos: um grupo com dois genes dominina e um grupo adjacente com um gene dominina e um segon. Esses dois grupos estão separados por um gene de RNA não codificante. Esse padrão de três a quatro cópias do gene dominina repete-se em *M. ariakensis*, *M. hongkongensis* e *M. nippona*. Provavelmente, essas espécies também possuem os genes dominina e segon agrupados, dado que suas localizações são extremamente próximas. A espécie *O. edulis* difere desse padrão de duplicação, visto que apresenta somente uma dominina em seu genoma, mas mantém o padrão de uma única cópia do gene segon adjacente ao gene dominina. Outro padrão conservado em todas as espécies é a orientação

transcricional invertida entre os genes dominina e segon. Em todos os genomas analisados, enquanto o(s) gene(s) dominina se encontra em um sentido, o gene segon encontra-se no sentido oposto.

Figura 6 - Localização cromossômica e análise de sintenia dos genes das famílias dominina e segon nos genomas de ostras



O painel superior exibe a localização gênica. As colunas verticais (azul claro) representam os cromossomos mapeados de sete espécies de ostras, com a escala em megabases (Mb). Os identificadores do GenBank (IDs) indicados ao lado de cada cromossomo correspondem aos genes de dominina (em preto) e segon (em azul). O esquema ao lado de cada cromossomo ilustra a organização genômica, no qual as setas pretas correspondem aos genes dominina e as setas azuis aos genes segon. A orientação da seta indica o sentido de transcrição: (►) para forward e (◄) para reverse. O painel inferior ilustra a análise de sintenia, comparando os cromossomos (Chr) homólogos de *C. virginica* (Chr09), *M. gigas* (Chr09) e *M. angulata* (Chr09). As colunas horizontais em verde claro representam os cromossomos. A linha em laranja e linha em azul-escuro destacam a relação colinear dos genes dominina e segon, respectivamente.

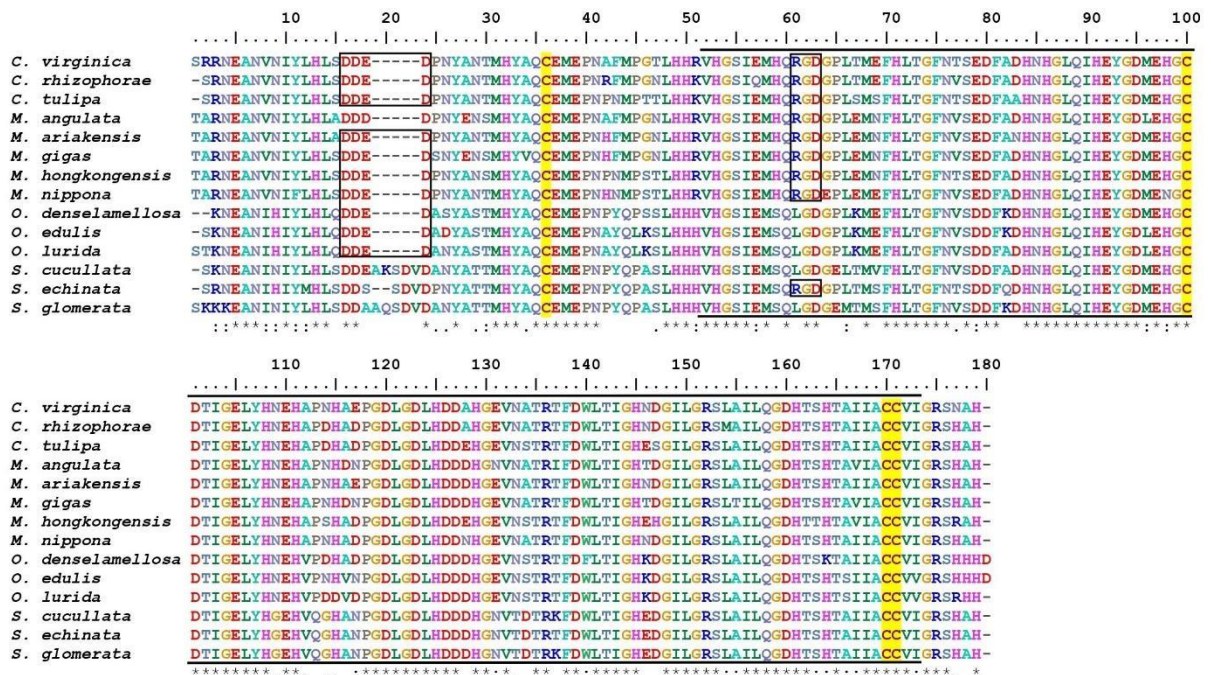
A análise de sintenia (**Figura 6**, painel inferior) revelou que tanto a dominina quanto a segon se encontram em uma região colinear em três espécies de ostras (*C. virginica*, *M. angulata* e *M. gigas*). A análise de sintenia para *O. edulis* não revelou relação de colinearidade com essas três espécies para os genes dominina e segon (dados não mostrados). Além disso, os genes dominina em clusters das três ostras estavam nas regiões colineares.

4.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

O alinhamento múltiplo das proteínas maduras de dominina (**Figura 7**) revelou um alto grau de conservação da estrutura primária entre as diferentes espécies. Essa conservação é evidenciada pela alta quantidade de resíduos idênticos ou por substituições conservativas. Destaca-se uma região N-terminal conservada em todas as espécies, composta por um bloco inicial de aproximadamente 27 resíduos altamente conservados. Uma análise detalhada desta região mostra substituições conservativas entre os gêneros *Crassostrea* e *Magallana* com *Ostrea* e *Saccostrea*. Dentro dessa região, está localizado um motivo funcional de ligação a LPS (DDED). No entanto, em *Saccostrea* esse motivo está ausente. Da mesma forma, a dominina da ostra *M. angulata* não apresenta esse motivo, mas vale pontuar que das cinco sequências de domininas encontradas nessa espécie, uma sequência anotada do genoma apresentava o motivo DDED (XM_052826792).

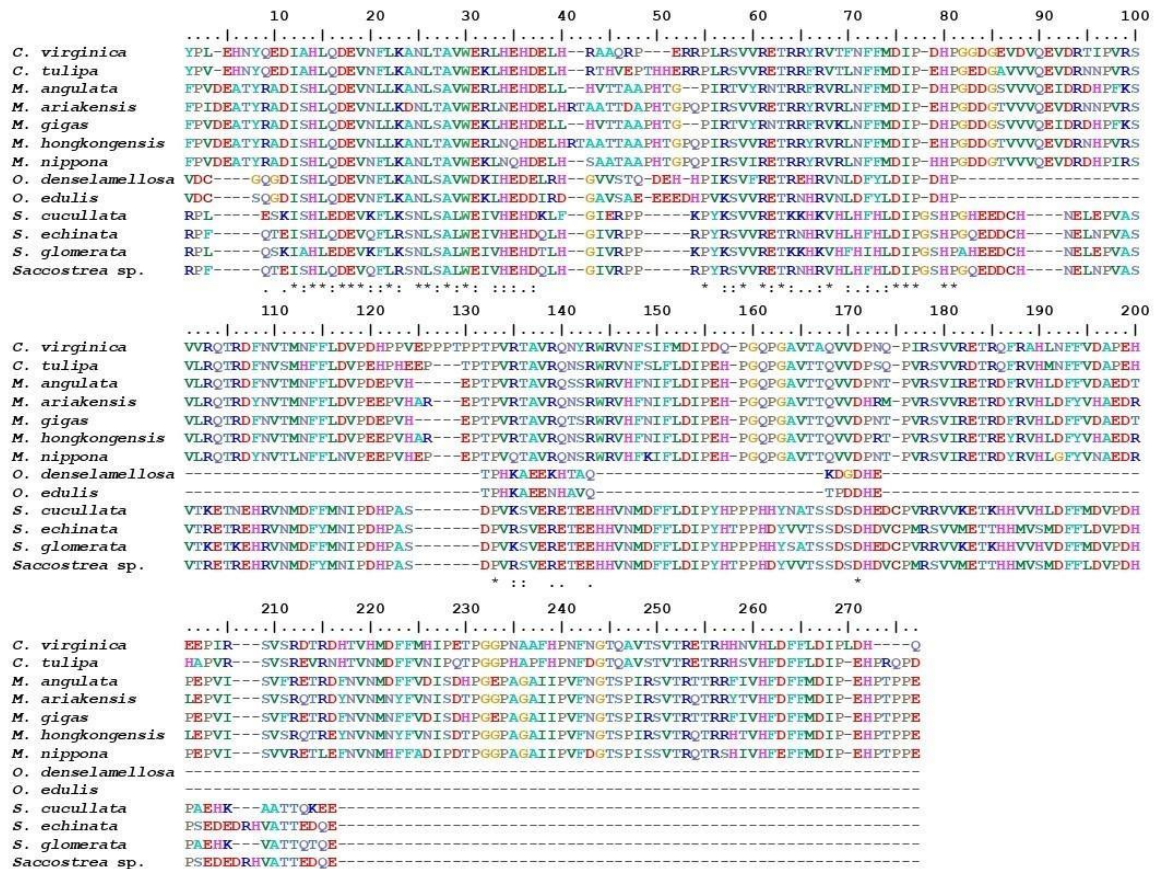
Um segundo motivo funcional, identificado na maioria das espécies, foi o de ligação à integrina (RGD) no início da sequência do domínio Cu/Zn-SOD. Entretanto, o motivo RGD não é identificado em *S. cucullata*, *S. glomerata* e nas duas espécies de *Ostrea*, nas quais a arginina (R) do motivo RGD é substituída pelo resíduo leucina (L). Cabe salientar que os resíduos da posição 30 em diante, compreendem os aminoácidos que são codificados pelos últimos quatro éxons de dominina (que são homólogos aos últimos éxons de segon). Destaca-se a alta conservação dessa porção, onde se localiza o domínio Cu/Zn-SOD e os quatro resíduos de cisteínas conservados em todas as espécies.

Figura 7 - Alinhamento múltiplo das proteínas dominina



A figura apresenta o alinhamento múltiplo da proteína madura de dominina de diferentes espécies de ostras. As sequências utilizadas para o alinhamento estão contidas na Tabela A1. Os resíduos conservados são indicados por asteriscos (*); dois pontos (':') indicam resíduos similares; um ponto ('.') indica resíduos pouco similares. As duas linhas pretas destacam o domínio Cu/Zn-SOD. Em amarelo, estão destacados os resíduos conservados de cisteína. Os resíduos indicados nos retângulos rosa e ciano indicam, respectivamente, o motivo de ligação à lipopolissacarídeos (DDED) e o motivo de ligação à integrina (RGD).

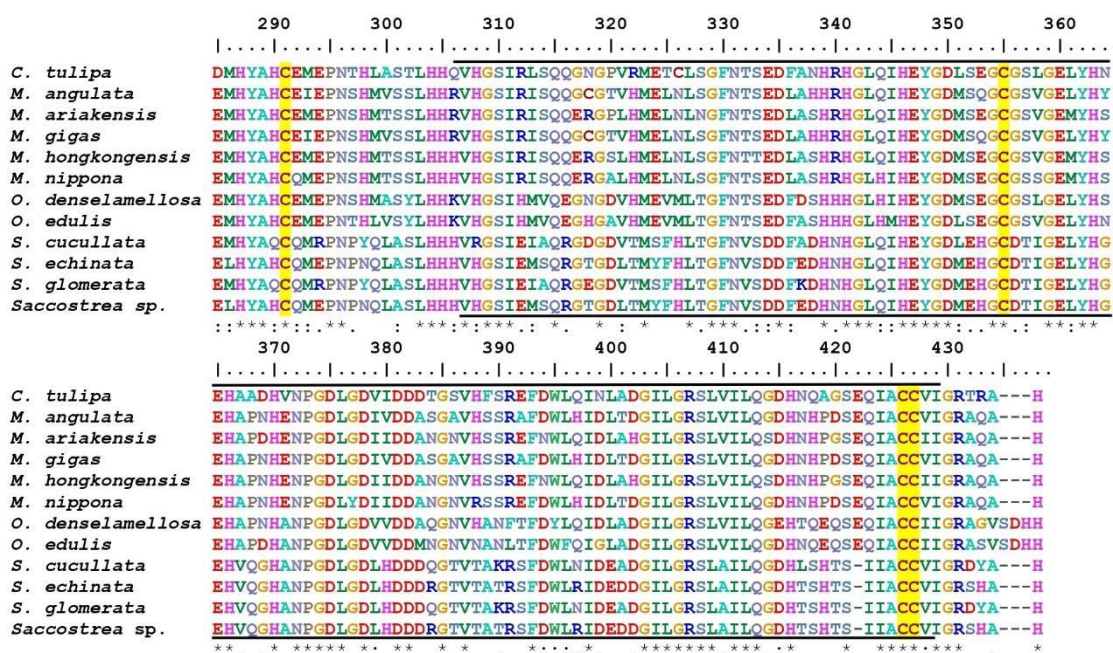
O alinhamento múltiplo da região N-terminal da proteína madura de segon (Figura 8) evidenciou, em contraste com as domininas, uma maior variabilidade geral observada sobretudo entre os gêneros. No entanto, foram identificadas duas regiões altamente conservadas no início das sequências, abrangendo os resíduos 9–37 e 55–81. Essa conservação é demonstrada pela alta quantidade de resíduos idênticos ou por substituições por aminoácidos similares. Ao observar com mais detalhes essas duas regiões e o restante do alinhamento, notam-se diversos aminoácidos específicos para cada gênero, com propriedades similares ou diferentes. Além disso, ao contrário das domininas, as sequências de segon não apresentaram motivos funcionais conhecidos, como DDED ou RGD.

Figura 8 - Alinhamento múltiplo da região N-terminal de proteínas segon

A figura apresenta o alinhamento múltiplo da região N-terminal da proteína madura de segon de diferentes espécies de ostras. As sequências utilizadas (Tabela A1) não apresentam o domínio SOD na região C-terminal. Os resíduos conservados são indicados por asteriscos (*); dois pontos (':') indicam resíduos similares; um ponto (':') indica resíduos pouco similares.

O alinhamento da região C-terminal das proteínas segon (**Figura 9**), que corresponde aos aminoácidos que são codificados pelos quatro últimos éxons e onde se localiza o domínio Cu/Zn-SOD, revelou um alto grau de conservação entre as espécies analisadas. Contudo, essa conservação é inferior à observada nas domininas, as quais apresentaram mais resíduos idênticos. O alinhamento confirma também que, assim como dominina, o domínio Cu/Zn-SOD de segon possui quatro resíduos de cisteína conservados.

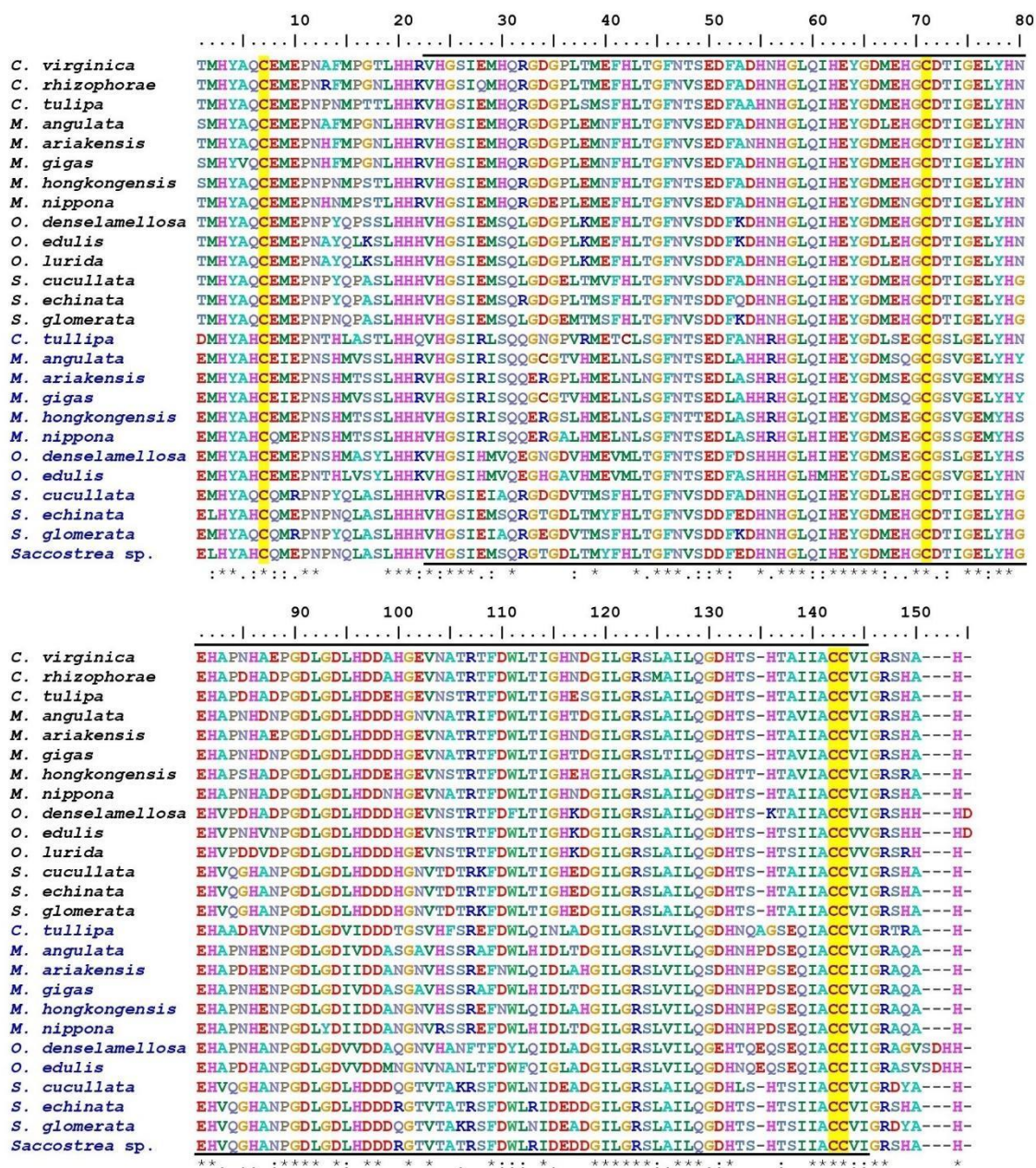
Figura 9 - Alinhamento múltiplo da região C-terminal das proteínas segun



A figura apresenta o alinhamento múltiplo da região C-terminal (domínio Cu/Zn-SOD) de segon de diferentes espécies de ostras. As sequências utilizadas para o alinhamento estão listadas na Tabela A1. O alinhamento desconsiderou a segon de *C. virginica*, por não possuir domínio Cu/Zn-SOD. Os resíduos conservados são indicados por asteriscos (*); dois pontos (':') indicam resíduos similares; um ponto ('.') indica resíduos pouco similares. As duas linhas pretas destacam o domínio Cu/Zn-SOD. Em amarelo são destacados os resíduos conservados de cisteína.

O alinhamento múltiplo das regiões homólogas de dominina e segon revelou um elevado grau de conservação (**Figura 10**) evidenciado pela presença de diversos resíduos idênticos e similares. Destacam-se os quatro resíduos de cisteína conservados na mesma posição em ambas as proteínas.

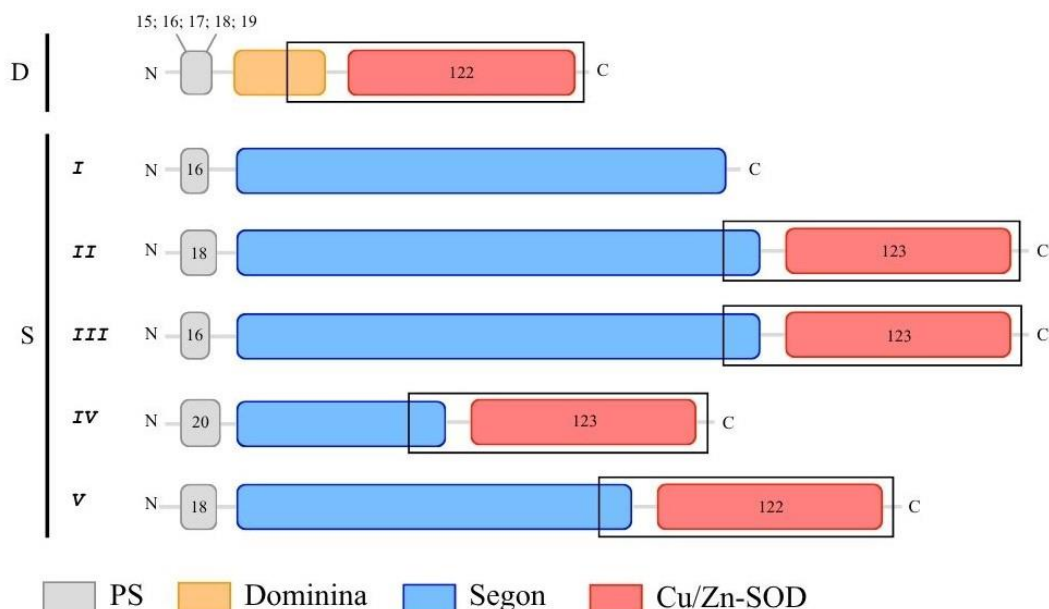
Figura 10 - Alinhamento múltiplo das regiões homólogas de dominina e segon



A figura apresenta o alinhamento múltiplo das regiões homólogas de dominina e segon de diferentes espécies de ostras. As sequências utilizadas para o alinhamento estão listadas na Tabela A1. O alinhamento desconsiderou a segon de *C. virginica* (região ausente). Os resíduos conservados são indicados por asteriscos (**); dois pontos (:) indicam resíduos similares; um ponto (.) indica resíduos pouco similares. As duas linhas pretas destacam a região SOD.

Em relação à organização estrutural, as domininas apresentam uma arquitetura conservada entre todas as espécies (**Figura 11**). Por outro lado, as proteínas segon possuem uma organização variável devido à diferença do comprimento da região N-terminal entre as espécies e à ausência do domínio Cu/Zn-SOD em *C. virginica*. Com exceção de *C. Virginica*, todas as proteínas de segon compartilham uma região C-terminal (que contém o domínio SOD) com dominina.

Figura 11 - Representação esquemática (em escala) da organização estrutural das proteínas dominina e segon em espécies de ostras



As sequências utilizadas para gerar o esquema estão contidas na Tabela A1. Os retângulos cinza, laranja, azul e vermelho representam respectivamente, o peptídeo sinal (PS), região dominina, região segon e domínio Cu/Zn-SOD. Os números dentro dos retângulos representam a quantidade de resíduos de aminoácidos daquela região (assim como, os números acima dos retângulos cinza da dominina). O retângulo de borda lisa destaca a região homóloga entre dominina e segon. Os números romanos (I-V) à esquerda das proteínas segon identificam os grupos de espécies com organização estrutural similar: I = *C. virginica*; II = *C. tulipa*; III = *M. angulata*, *M. gigas*, *M. hongkongensis*, *M. ariakensis* e *M. nippona*; IV = *O. denselamellosa* e *O. edulis*; V = *S. cucullata*; S. *echinata*, *S. glomerata* e *Saccostrea* sp. A dominina é representada por um único esquema devido ao seu tamanho conservado (peptídeo maduro de 173 a 179 resíduos).

As análises filogenéticas, realizadas a partir do alinhamento das sequências codificantes (CDS) completas de cada gene e enraizadas com uma Cu/Zn-SOD citosólica (Mg-cyto-SOD) demonstraram que as domininas se agrupam em um clado com forte suporte estatístico (97%) (**Figura 12**). As sequências de segon também se agruparam em um clado distinto; contudo, o nó ancestral que suporta este clado apresentou baixo suporte estatístico (34%). Apesar disso, dentro de cada clado (dominina e segon), a topologia da árvore agrupou as sequências por gênero (relações de ortologia) com altos valores de *bootstrap*.

Destaca-se que a filogenia construída com a proteína madura agrupou as sequências de segon e de dominina de *Saccostrea* dentro do clado de dominina (dados não mostrados). O alinhamento da dominina e da segon de *Saccostrea* evidenciou alta conservação dos resíduos do domínio Cu/Zn-SOD de ambas as proteínas, conservação maior do que a observada em outras espécies, como *M. gigas* (dados não mostrados).

Figura 12 - Árvore filogenética de dominina e segon de ostras

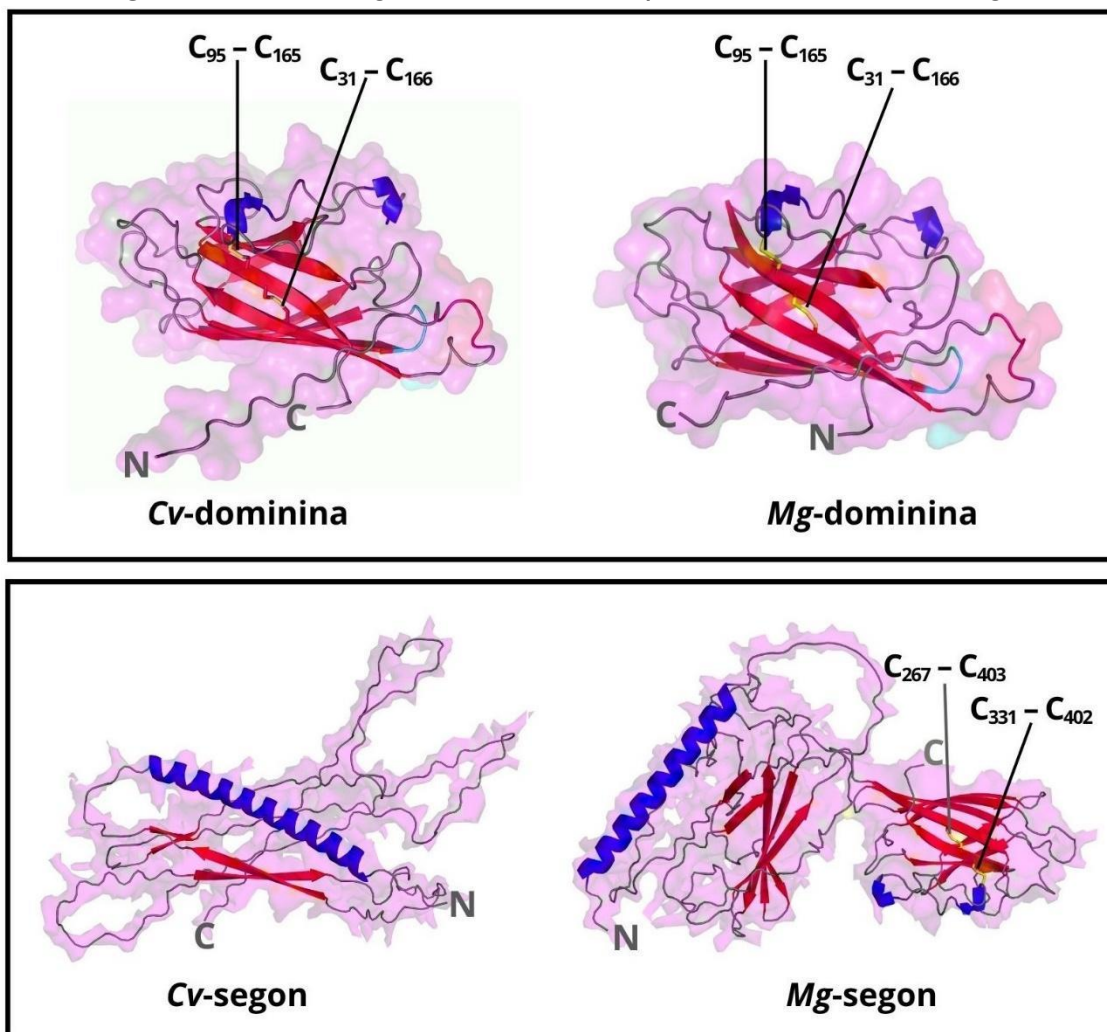
A árvore filogenética foi construída com base no alinhamento da região codificante (CDS) e pelo método de Máxima Verossimilhança, considerando apenas as primeiras posições dos códons. Os números nos nós representam os valores de *bootstrap*, com 1.000 réplicas. As sequências da dominina estão em preto e as da segon em azul. A superóxido dismutase citosólica de *M. gigas* foi utilizada como grupo externo (*Mg-cyto-SOD*).

4.4 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

Os modelos 3D de dominina revelaram que sua estrutura tridimensional é altamente conservada, apresentando uma conformação clássica de Cu/Zn-SOD (**Figura 13** painel superior). A proteína é composta por oito fitas beta antiparalelas que se dobras em uma configuração de barril-beta do tipo “chave grega”, com duas pequenas alfa-hélices presentes em duas das alças externas. Essas estruturas são estabilizadas por duas ligações de dissulfeto: uma conecta duas fitas beta (C₃₁ – C₁₆₆) e a outra liga uma fita-beta a uma alfa-hélice (C₉₅ – C₁₆₅). Além disso, os motivos

funcionais se encontram na região de *loop* que antecede o barril-beta (DDED) e em uma das alças externas que conectam as fitas beta (RGD), ambos expostos na face externa da proteína.

As análises dos modelos tridimensionais de segon revelaram estruturas distintas (**Figura 13** painel inferior). A Cv-segon, que não possui o domínio Cu/Zn-SOD, apresentou uma estrutura mais simples, composta por uma longa alfa-hélice na região N-terminal e duas regiões de fitas beta. Por outro lado, a análise da Mg-segon, que possui domínio Cu/Zn-SOD, revelou que a proteína se dobra em duas cadeias: (1) uma cadeia N-terminal com uma longa alfa-hélice e duas fitas beta, estruturalmente similar à da *C. virginica* e (2) uma cadeia C-terminal com conformação análoga à da dominina (descrita anteriormente) adotando a clássica estrutura Cu/Zn-SOD. Outra semelhança observada com dominina foi a formação de ligações dissulfeto dentro do domínio Cu/Zn-SOD em *M. gigas*. O modelo da segon de *M. gigas* previu que suas quatro cisteínas conservadas formam ligações da mesma forma que ocorre em dominina: uma ligação conecta duas fitas beta (C₂₆₇ – C₄₀₃) e a outra conecta uma fita-beta a uma alfa-hélice (C₃₃₁ – C₄₀₂). Vale ressaltar as diferenças na confiabilidade das predições (pLDDT). A dominina e o domínio C-terminal de Mg-segon apresentaram alta confiança (pLDDT de ~90 %), pois a estrutura tridimensional Cu/Zn-SOD é bem consolidada, o que não é o caso da região N-terminal das proteínas segon de *M. gigas* (pLDDT ~30 %).

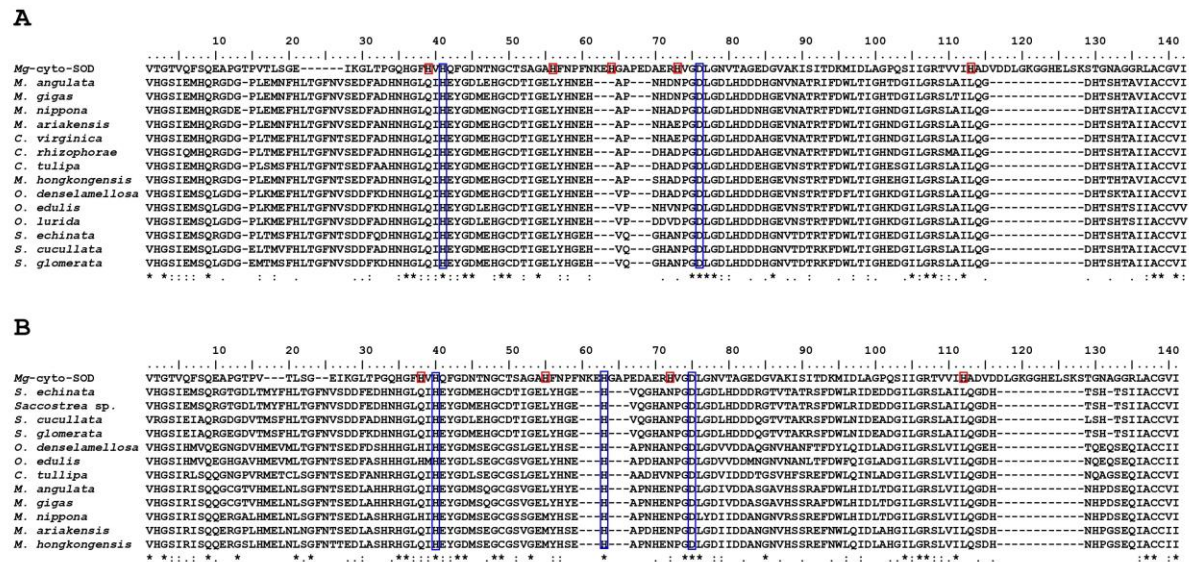
Figura 13 - Modelagem estrutural das proteínas dominina e segon

O painel superior mostra o modelo da estrutura tridimensional de *C. virginica* (Cv-dominina) e de *M. gigas* (Mg-dominina). O painel inferior mostra os modelos tridimensionais de *C. virginica* (Cv-segon) e de *M. gigas* (Mg-segon). As estruturas secundárias estão representadas por fitas beta (vermelho), alfa-hélice (azul) e loops (cinza). As cores rosa e ciano na estrutura 3D de dominina indicam, respectivamente, os motivos DDED e RGD. Em amarelo indicam-se as ligações dissulfeto nos modelos estruturais de dominina e de Mg-segon.

Para avaliar se as proteínas dominina e segon possuem resíduos essenciais para a atividade da superóxido dismutase, foi realizado um alinhamento com uma Cu/Zn-SOD citosólica de *M. gigas* (Mg-cyto-SOD) que possui atividade da superóxido dismutase comprovada (Liu *et al.*, 2022; Ruan *et al.*, 2022) (**Figura 14**). A Mg-cyto-SOD possui os sete resíduos-chave no sítio ativo, envolvidos na ligação ao cobre e zinco. Quatro resíduos são críticos para a ligação ao cobre (H49, H51, H66, H123) e quatro para a ligação ao zinco (H66, H74, H83, D86), sendo H66 o resíduo ponte que liga ambos os metais. O alinhamento revelou que as proteínas dominina conservam

apenas dois desses setes resíduos críticos (H51 e D86). As proteínas segon, por sua vez, conservam três desses resíduos (H51, H74 e D86), sendo que as espécies do gênero *Ostra* e a espécie *M. nippona* compartilham um quarto resíduo (H49).

Figura 14 - Alinhamento múltiplo dos domínios Cu/Zn-SOD das proteínas dominina e segon com uma proteína Cu/Zn-SOD citosólica de *Magallana gigas* (Mg-cyto-SOD)



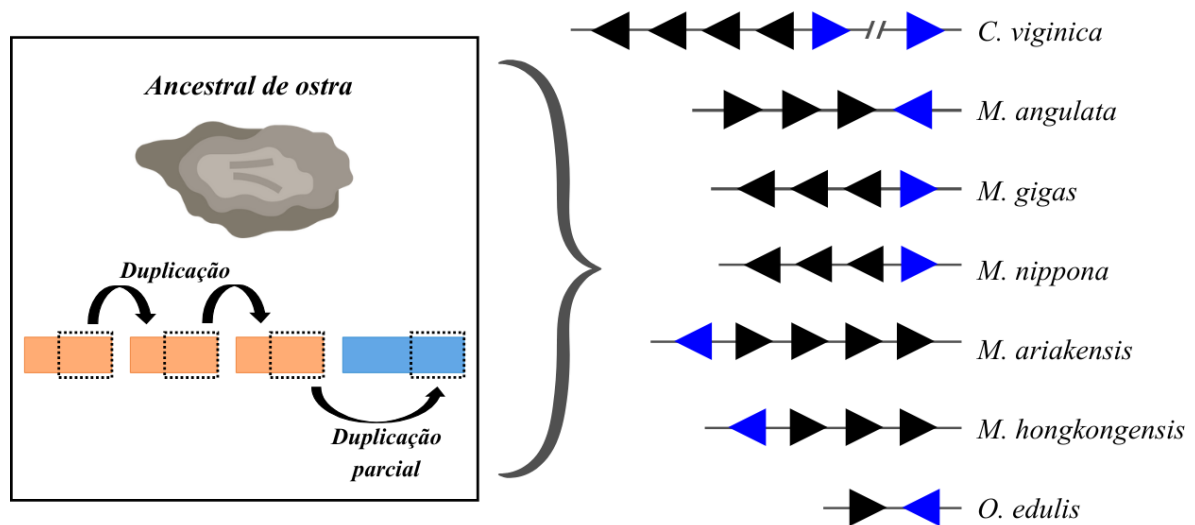
Alinhamento múltiplo dos domínios Cu/Zn-SOD de proteínas dominina (A) e segon (B) com Mg-cyto-SOD. Os sete resíduos que compõem o sítio ativo de Mg-cyto-SOD estão indicados pelos retângulos. As cores dos retângulos indicam se esses resíduos são compartilhados ou não: vermelho indica que são exclusivos de Mg-cyto-SOD e azul indica que são compartilhados entre as sequências de dominina e segon.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade molecular evolutiva de dominina e segon, os componentes majoritários do plasma de ostreídeos. Conforme mencionado anteriormente, o conhecimento sobre essas proteínas é ainda limitado, especialmente sobre a segon, que, como os resultados mostraram, é a proteína que apresenta maior variação entre as espécies. Um dos principais achados deste estudo é a constatação de que todas as proteínas segon contêm um domínio Cu/Zn-SOD, com exceção da segon de *C. virginica*. Esse resultado representa uma novidade, visto que a única segon descrita até o momento (Cv-segon) não possui esse domínio. Paralelamente, os dados de caracterização molecular da dominina corroboram e ampliam o conhecimento existente sobre essa família. A alta conservação da massa molecular e do ponto isoeletrico teórico das 14 espécies analisadas está em concordância com o que foi relatado na literatura para espécies como *M. gigas*, *C. virginica* e *S. glomerata* (Gonzalez *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2011). Em contraste, a família segon apresentou um padrão distinto. Os resultados mostram que, enquanto a região C-terminal (Cu/Zn-SOD) permaneceu conservada, a região N-terminal da segon variou muito entre as espécies, sobretudo em nível de gênero, o que explica a grande diferença de massa molecular.

Esse padrão de N-terminal variável e C-terminal conservado nas proteínas segon pode ser explicado pela história evolutiva. Os resultados mostram que a dominina é um gene mais antigo, pois foram encontrados homólogos em mexilhões do gênero *Perna*, enquanto a presença de segon não foi detectada em outros moluscos. Isso sugere que a segon é uma novidade evolutiva da família Ostreidae, que surgiu após a separação de mexilhões e ostras, enquanto dominina é um gene mais antigo. Essa ideia é reforçada pela contagem dos genes. A busca no genoma de *Perna viridis* revelou apenas uma cópia do gene dominina (dados não mostrados). Em contraste, na maioria das ostras, o gene dominina forma um cluster de 3-4 cópias. Isso revela que o gene ancestral dominina sofreu duplicações em ostras (**Figura 15**). Ademais, o fato de os últimos quatro éxons de dominina e segon serem homólogos indica que provavelmente segon surgiu após uma duplicação parcial do gene dominina. Essa duplicação parcial incluía o bloco de éxons do domínio Cu/Zn-SOD, que deu origem à região C-terminal conservada do novo gene segon.

Figura 15 - Modelo proposto para a evolução dos genes dominina e segon em ostras



A figura ilustra que um único gene dominina (retângulo laranja-claro) no ancestral de ostra foi duplicado em tandem, dando origem a múltiplas cópias. Subsequentemente, uma duplicação parcial (bloco pontilhado) de um desses genes dominina se inseriu na região do novo gene segon (retângulo azul claro). Atualmente, a organização gênica em ostras mostra genes domininas (setas pretas) duplicados na maioria das espécies e o gene segon (setas azuis) localizado adjacente. A orientação da seta indica o sentido de transcrição: (▶) para forward e (◀) para reverse.

A organização gênica dos genes dominina e segon em ostras também reforça essa hipótese, visto que segon localiza-se adjacente ao cluster de dominina, mantendo sempre o sentido de transcrição invertido em relação a esses genes. Provavelmente, o padrão misto de conservação de segon é devido ao fato de que a região C-terminal (homóloga à dominina) permaneceu bastante conservada entre as espécies, pois apresenta uma função vital para ostras. Por outro lado, a região N-terminal pode evoluir livremente, o que levou à grande variação de tamanho e composição que se observa atualmente entre os gêneros. No entanto, as proteínas segon compartilham uma região conservada no início da região N-terminal, que evidencia serem da mesma família. Em *Saccostrea* observou-se grande conservação da região C-terminal (região do domínio SOD) de segon com dominina. Entretanto, o alinhamento da região N-terminal de segon e a filogenia confirmam que as proteínas segon de *Saccostrea* são realmente pertencentes a esta família. A segon de *C. virginica* é uma exceção, pois não possui essa região C-terminal. Isso demonstra que, possivelmente, a Cv-segon sofreu uma deleção secundária que removeu toda a região C-terminal (Cu/Zn-SOD).

A modelagem tridimensional de dominina demonstrou uma estrutura conservada, com um clássico barril-beta “chave grega” do domínio Cu/Zn-SOD. Além

disso, a análise estrutural mostrou que os motivos funcionais (DDED e RGD) estão voltados para a face externa, expostos para interagir com o LPS de bactérias e com a integrina de hemócitos. Entretanto, apesar da alta conservação das domininas, os dados deste trabalho revelam divergência em relação a esses motivos funcionais entre as espécies de ostras. Foram identificados motivos funcionais de ligação ao LPS e à integrina em *Crassostrea* e *Magallana*. Isso mostra que essas proteínas atuam, provavelmente, como PRPs e opsoninas. Corroborando essa ideia, observou-se que a dominina de *M. gigas* é capaz de se ligar a diversos PAMPs, como LPS, peptidoglicano, Poli (I:C) e que apresenta capacidade de opsonização (Duperthuy *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016). No entanto, esses motivos parecem ter sido modificados em outras linhagens. Em *S. cucullata* e *S. glomerata* não foram identificados esses motivos, o que indica que elas perderam seu papel de opsonina. Contudo, *S. echinata* mantém o motivo funcional de ligação à integrina, mesmo pertencendo ao mesmo gênero. Em *Ostrea*, por sua vez, ocorre algo curioso: ela manteve o motivo de ligação ao LPS, mas perdeu o motivo de ligação à integrina. Assim, a dominina de *Ostrea* possui capacidade de ligar a microrganismos, mas não é capaz de ligá-los diretamente aos hemócitos. Essa função de opsonização, embora essencial para a defesa, pode ser explorada por patógenos para invadir os hemócitos. Foi visto que essa característica de opsonização em *M. gigas* favorece a virulência do patógeno *V. atlanticus* LGP3. A *Mg*-dominina se liga à porina OmpU (molécula essencial para a virulência) da bactéria e à integrina dos hemócitos, facilitando a invasão da célula imune pela bactéria que sobrevive intracelularmente (Duperthuy *et al.*, 2011). Dessa forma, a perda de pelo menos um motivo funcional pode ser uma adaptação evolutiva para escapar de armadilhas patogênicas específicas.

Apesar de a proteína mais abundante de ostra apresentar domínio Cu/Zn-SOD, era conhecido que ela não possuía atividade típica de superóxido dismutase em *C. virginica*, *M. gigas* e *S. glomerata* (Green *et al.*, 2009; Itoh *et al.*, 2011; Scotti *et al.*, 2001). As análises dos resíduos catalíticos essenciais confirmam isso, mas agora para um número maior de espécies (14 espécies). A falta de 5 dos 7 resíduos-chave de ligação a cobre e zinco mostra que a perda de função é conservada em toda a família dominina. Da mesma forma, este estudo é o primeiro a mostrar que a família segon também não apresenta alguns resíduos essenciais para atividade de superóxido dismutase, o que era esperado devido à sua homologia com a dominina. Ressalta-se, no entanto, é que apesar de perderem alguns resíduos de catálise, ambas as famílias

compartilham e conservam resíduos-chave específicos de ligação a metais. Essa descoberta reforça a ideia de que a real função dessas proteínas esteja associada ao transporte, sequestro ou biotransformação de metais (Itoh *et al.*, 2011; Scotti; Dearing; Greenwood, 2007).

Por serem organismos filtradores sésseis, as ostras estão em constante contato com diversos microrganismos do ambiente. Para sobreviver, esses animais desenvolveram mecanismos de defesa sofisticados, incluindo a expansão de diversas famílias gênicas envolvidas na resposta imune e no estresse abiótico (Guo *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016, 2015). Entre os genes que sofreram essa expansão, destacam-se as superóxido dismutases extracelulares (ecSOD) (Guo *et al.*, 2015). Nesse contexto evolutivo, a expansão da dominina levou ao surgimento do gene segon, que apresenta alta diversidade entre as espécies (sobretudo em sua região N-terminal), conferindo prováveis adaptações específicas em nível de gênero. Portanto, pesquisas futuras devem investigar as funções da segon em nível de gênero para verificar possíveis diferenças de funcionalidade. Além disso, dominina e segon compartilham diversas similaridades, uma vez que todas são glicoproteínas ácidas, possuem um domínio Cu/Zn-SOD compartilhado (exceto Cv-segon) e não apresentam atividade típica de superóxido dismutase. Além disso, ambas as proteínas são expressas nos hemócitos e possuem propriedades de ligação a metais, como cálcio, ferro e zinco (Itoh *et al.*, 2011; Scotti; Dearing; Greenwood, 2007). A associação dessas proteínas é tão forte que sugere uma atuação em cooperação funcional. Em *C. virginica*, foi demonstrado que a dominina e a segon formam um complexo multiproteico e apresentam o mesmo padrão de expressão gênica em resposta ao dano na concha (Xue; Beguel; La Peyre, 2019). Isso sugere uma atuação conjunta na biomineralização e enfatiza a importância dessas proteínas em ostras.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho expande o conhecimento sobre a dominina e a segon, as duas principais famílias de proteínas do plasma de ostras, e revela que essas proteínas são complexas e apresentam muitas características similares. As domininas se expandiram em ostras e a segon surgiu por meio deste evento. A alta conservação das domininas e da região C-terminal da segon indica que elas exercem uma função essencial para as ostras. Por outro lado, a região N-terminal variável da segon sugere que essa proteína pode ter adquirido funções particulares em cada linhagem. Por fim, o domínio Cu/Zn-SOD (cataliticamente inativo), presente em ambas as famílias, provavelmente está relacionado a funções do sistema imune e ao metabolismo de metais.

REFERÊNCIAS

- ALADAILEH, S. *et al.* Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 48–63, 2007.
- ALLAM, B.; RAFTOS, D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 131, p. 121–136, 2015.
- BACHÈRE, E. *et al.* Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 198, n. 1, p. 149–168, 2004.
- BACHÈRE, E. *et al.* The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 50–64, 2015.
- CHENG, T. C.; HOWLAND, K. H. Chemotactic attraction between hemocytes of the oyster, *Crassostrea virginica*, and bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 204–210, 1979.
- DE LA BALLINA, N. R. *et al.* Bivalve haemocyte subpopulations: a review. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, p. 826255, 2022.
- DE LA FOREST DIVONNE, S. *et al.* Diversity and functional specialization of oyster immune cells uncovered by integrative single-cell level investigations. **eLife**, [s. l.], v. 13, p. RP102622, 2025.
- DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. *et al.* Cross-talk and mutual shaping between the immune system and the microbiota during an oyster's life. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, [s. l.], v. 379, n. 1901, p. 20230065, 2024.
- DINER, R. E. *et al.* Host and water microbiota are differentially linked to potential human pathogen accumulation in oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 89, n. 7, p. e0031823, 2023.
- DUPERTHUY, M. *et al.* Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 7, p. 2993–2998, 2011.
- FRANCHINI, A.; OTTAVIANI, E. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF-beta1. **Tissue & Cell**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 312–321, 2000.
- GOLDSTEIN, I. J.; HAYES, C. E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, [s. l.], v. 35, p. 127–340, 1978.

GONZALEZ, M. *et al.* Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 338, n. 2, p. 1089–1097, 2005.

GREEN, T. J. *et al.* Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 799–810, 2009.

GREEN, T. J. *et al.* Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has antiviral activity against herpesviruses. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 110, p. 168–174, 2014.

GUO, X. *et al.* Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 46, n. 1, SI: Molluscan Immunity, p. 107–119, 2015.

HUVET, A. *et al.* The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. **Gene**, [s. l.], v. 343, n. 1, p. 211–220, 2004.

ITOH, N. *et al.* Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 9–22, 2011.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 20, p. 197–216, 2002.

LABREUCHE, Y. *et al.* Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental and Comparative Immunology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 367–379, 2006.

LIU, M. *et al.* Characterization of water microbiota and their relationship with resident oysters during an oyster mortality event. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. e0288123, 2024.

LIU, Y. *et al.* Genome-wide identification and characterization of superoxide dismutases in four oyster species reveals functional differentiation in response to biotic and abiotic stress. **BMC genomics**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 378, 2022.

LIU, C. *et al.* The modulation of extracellular superoxide dismutase in the specifically enhanced cellular immune response against secondary challenge of *Vibrio splendidus* in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Developmental and Comparative Immunology**, [s. l.], v. 63, p. 163–170, 2016.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969.

MCCORD, J. M.; KEELE, B. B.; FRIDOVICH, I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, [s. l.], v. 68, n. 5, p. 1024–1027, 1971.

MONTAGNANI, C. *et al.* Trained immunity: Perspectives for disease control strategy in marine mollusc aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 1472–1498, 2024.

MOUNT, A. S. *et al.* Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 304, n. 5668, p. 297–300, 2004.

NETEA, M. G. *et al.* Innate and adaptive immune memory: an evolutionary continuum in the host's response to pathogens. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 13–26, 2019.

PALES ESPINOSA, E.; ALLAM, B. High spatial resolution mapping of the mucosal proteome of the gills of *Crassostrea virginica*: implication in particle processing. **The Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 224, n. Pt 4, p. jeb233361, 2021.

POIRIER, A. C. *et al.* Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 289, n. 36, p. 24821–24831, 2014.

RUAN, Z. *et al.* Molecular characterization of two CuZn-SOD family proteins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, [s. l.], v. 260, p. 110736, 2022.

SALVI, D.; MACALI, A.; MARIOTTINI, P. Molecular phylogenetics and systematics of the Bivalve family Ostreidae based on rRNA sequence-structure models and multilocus species tree. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. e108696, 2014.

SALVI, D.; MARIOTTINI, P. Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 179, n. 2, p. 263–276, 2016.

SCOTTI, P. D. *et al.* Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Bivalvia: Mytilidae). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, [s. l.], v. 128, n. 4, p. 767–779, 2001.

SCOTTI, P. D.; DEARING, S. C.; GREENWOOD, D. R. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 91–101, 2007.

TANGUY, A.; GUO, X.; FORD, S. E. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. **Gene**, [s. l.], v. 338, n. 1, p. 121–131, 2004.

TARIS, N. *et al.* Transcriptome response of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to infection with *Vibrio tubiashii* using cDNA AFLP differential display. **Animal Genetics**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 663–677, 2009.

TREVISAN, R. *et al.* The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 101, p. 81–90, 2014.

TREVISAN, R. *et al.* Thiol oxidation of hemolymph proteins in oysters *Crassostrea brasiliensis* as markers of oxidative damage induced by urban sewage exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 1833–1845, 2017.

UNZUETA-MARTÍNEZ, A. *et al.* Microbiomes of the sydney rock oyster are acquired through both vertical and horizontal transmission. **Animal Microbiome**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 32, 2022.

UNZUETA-MARTÍNEZ, A.; BOWEN, J. Persistent tissue-specific resident microbiota in oysters across a broad geographical range. **Environmental Microbiology Reports**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. e70026, 2024.

XUE, Q. *et al.* Identification of a novel metal binding protein, segon, in plasma of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 74–85, 2012.

XUE, Q.; BEGUEL, J.-P.; LA PEYRE, J. Dominin and segon form multiprotein particles in the plasma of Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and are likely involved in shell formation. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 10, p. 566, 2019.

ZHANG, L. *et al.* Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, p. 8693, 2015.

ZHANG, G. *et al.* Molecular basis for adaptation of oysters to stressful marine intertidal environments. **Annual Review of Animal Biosciences**, [s. l.], v. 4, p. 357–381, 2016.

ZHANG, T. *et al.* The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. **Developmental and Comparative Immunology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 141–150, 2014.

APÊNDICE

Tabela A1 - Parâmetros bioquímicos de sequências representativas de dominina e segon

DOMININA							
Espécie	ID GenBank	Precursor	PS	PM	MM (kDa)	pI	pfam00080
<i>C. virginica</i>	AB269930	192	18	174	19,39	5,12	47-168
<i>C. rhizophorae</i>	JBEOLP010000055 (565980..568647)	191	18	173	19,33	5,18	46-167
<i>C. tulipa</i>	KU710254	191	18	173	19,21	5,11	46-167
<i>M. angulata</i>	XM_052826790	192	18	174	19,4	5,02	47-168
<i>M. ariakensis</i>	CM035820 (2877298..2880034)	193	19	174	19,46	5,19	47-168
<i>M. gigas</i>	XM_011416093	192	18	174	19,44	4,91	47-168
<i>M. hongkongensis</i>	KJ741847	192	18	174	19,45	5,13	47-168
	CM027467 (50690840..50693263)	192	18	174	19,40	5,02	47-168
<i>M. nippona</i>	CM065924 complement (3955546..3957799)	192	18	174	19,49	4,98	47-168
<i>O. denselamellosa</i>	JAMZEH010000065 complement (6556246..6560639)	191	18	173	19,37	5,11	45-166
<i>O. edulis</i>	XM_048900234	192	18	174	19,58	5,25	46-167
<i>O. lurida</i>	CAJDSM010001348 complement (12022..16496)	189	15	174	19,5	5,04	46-167
<i>S. cucullata</i>	XM_062751482	194	16	178	19,65	4,95	51-172
<i>S. echinata</i>	XM_061324005	193	17	176	19,53	5,07	49-170
<i>S. glomerata</i>	PRKT01000576 complement (212896..217444)	195	16	179	19,73	5,1	52-173
SECON							
Espécie	ID GenBank	Precursor	PS	PM	MM (kDa)	pI	pfam00080
<i>C. virginica</i>	XM_022454743	277	16	261	30,5	5,92	-
<i>C. tullipa</i>	KU710253	432	18	414	47,38	5,88	286-408
<i>M. angulata</i>	XM_052828108	427	16	411	46,66	5,5	283-405
<i>M. ariakensis</i>	CM035820 complement (2836987..2843430)	433	16	417	47,68	5,77	289-411
<i>M. gigas</i>	XM_011416094	427	16	411	46,6	5,55	283-405
<i>M. hongkongensis</i>	CM027467 complement (50676970..50684199)	427	16	411	46,66	5,55	283-405
<i>M. nippona</i>	CM065924 (3977310..3984305)	431	16	415	47,11	5,58	287-409
<i>O. denselamellosa</i>	JAMZEH010000065 (6571129..6576491)	263	20	243	27,29	5,17	112-216
<i>O. edulis</i>	XM_048900231	264	20	244	27,27	4,92	113-235
<i>S. cucullata</i>	NW_026918657 (40755..44540)	357	18	339	38,65	5,57	212-333
<i>S. echinata</i>	XM_061324007	360	18	342	39,27	5,18	215-336
<i>S. glomerata</i>	PRKT01000576 (181577..185038)	357	18	339	38,68	5,74	212-333
<i>Saccostrea sp.</i>	GGZM01047307	360	18	342	39,26	5,18	215-336

A tabela apresenta os parâmetros para uma sequência representante de cada espécie. PS = peptídeo sinal (valores em resíduos de aminoácidos); PM = proteína madura (valores em resíduos de aminoácidos); MM = massa molecular predita em kDa; pI = ponto isoelétrico teórico; PF00080 = região aminoacídica que compreende o domínio Cu/Zn-SOD (Superoxide dismutase; SOD; EC 1.15.1.1).