

Cairé Barreto Vieira

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
TRANSCRICIONAL DE CRUSTINAS DO TIPO I NO
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis
2016

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

Vieira, Caire Barreto

Identificação e caracterização molecular e transcricional de Crustinas do Tipo I no camarão *Litopenaeus vannamei* / Caire Barreto Vieira ; orientador, Rafael Diego da Rosa - Florianópolis, SC, 2016.

89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

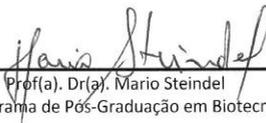
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Imunologia de Invertebrados. 3. Peptídeos Antimicrobianos. 4. Crustinas. 5. *Litopenaeus vannamei*. I. Rosa, Rafael Diego da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**"Identificação e caracterização molecular e transcricional de Crustinas do Tipo I
no camarão *Litopenaeus vannamei*"**

Por

Caíré Barreto Vieira

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (26/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Mario Steindel
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr(a) Rafael Diego da Rosa (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Margherita Anna Barracco (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Mario Steindel (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Andrea Rita Makrro (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 31 de Agosto de 2016.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que conviveram comigo neste período, direta ou indiretamente e que me deram base para seguir firme em minha formação acadêmica, especialmente à minha mãe Maria das Graças e ao meu pai Adeildo Vieira.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Rafael Diego da Rosa por todo o incentivo, dedicação, responsabilidade e competência em ensinar e orientar. Agradeço profundamente por ter me aceitado como seu aluno de mestrado e ter me dado a grande oportunidade de desenvolver um projeto pelo qual me envolvi inteiramente e me fascinei. Você fez parte de um momento único na minha vida, onde saí de casa na plenitude dos meus vinte e um anos pra seguir minha carreira acadêmica tão longe. Essa, sem dúvida, foi uma das experiências mais importantes da minha vida e ter você fazendo parte disso pra mim é uma honra! Sou feliz por ser teu aluno, sou feliz por fazer parte do LIAA, sou feliz por todo aprendizado e todas as oportunidades científicas que você me proporcionou. Muito obrigado pela confiança!

À professor Dra. Luciane Maria Perazzolo pelos ensinamentos, pelo companheirismo e por todo auxílio durante a execução do meu trabalho.

Aos membros da banca, Dra. Margherita Anna Barracco, Dra. Andrea Marrero, Dr. Mario Steindel e Dr. Glauber Wagner pela disponibilidade de participar da avaliação deste trabalho e de contribuir com minha formação profissional.

Ao CNPq pelo pagamento da bolsa e à CAPES pelo financiamento do projeto (Edital Ciências do Mar 2 n° 43/2013).

Aos meus pais Maria das Graças e Adeildo Vieira e meus irmãos Uaná Barreto e Rudá Barreto por compartilharem comigo todas as vitórias e os momentos de felicidade. Apesar da distância, vocês jamais estiveram longe de mim e agradeço profundamente todos os dias por tê-los em minha vida. Vocês são as peças mais fundamentais e essenciais da minha existência.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho Amanda, Emily, Grazi, Jaque, Mari, Gabriel, Anderson, Nicolas, Marco, Marcelo e Fabio pela agradabilíssima presença que tornou esse período da minha vida inesquecível.

À minha namorada Jessica Saldanha pelo companheirismo, pelo auxílio nos momentos mais apertados, pelo amor tão grande e o carinho singular. Você me ajudou a construir essa história e sou grato por todos os dias em que passamos juntos. Te amo muito!

Aos meus amigos e companheiros de morada Thiago e Rafael pelos momentos maravilhosos compartilhados no dia a dia, pelas brincadeiras e por tornarem mais fácil meus momentos de tensão.

Aos meus grandes amigos Natanael, Fernando e Raianna por, apesar de longe, estarem sempre presentes nas conversas e descontrações.

Aos professores responsáveis pelas disciplinas do mestrado pela partilha do conhecimento científico e pela contribuição na minha formação intelectual.

A todos os funcionários da universidade que promoveram a manutenção de um ambiente propício ao trabalho, em especial, aos servidores do Restaurante Universitário pela inestimável importância no meu cotidiano.

Meus profundos agradecimentos a todos que participaram direta ou indiretamente da execução deste trabalho!

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas essenciais do sistema imune de diversos organismos, participando eficientemente no combate a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos. Em camarões, quatro principais famílias de AMPs foram descritas, dentre as quais se destacam as crustinas. Essa família encontra-se distribuída em diversas espécies de crustáceos e apresenta atividades antimicrobianas e antiproteolíticas. Classicamente, as crustinas estão divididas em 5 principais grupos, referidos como Tipos I a V. No camarão *Litopenaeus vannamei*, apesar de terem sido reportadas crustinas dos Tipos II, III e IV, até o presente ainda não foram descritas crustinas do Tipo I. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar, em nível molecular e transcricional, crustinas do Tipo I em *L. vannamei*. Sequências de crustinas do Tipo I foram buscadas em bancos transcriptômicos não anotados de *L. vannamei* (GenBank), submetidas a reconstruções filogenéticas para confirmação de sua autenticidade e usadas no desenho de iniciadores para análises de expressão gênica. Doze sequências de *L. vannamei* foram resgatadas utilizando-se 41 sequências de crustinas do Tipo I de 22 espécies de crustáceos como referência. As análises filogenéticas indicaram a existência de, pelo menos, dois Subtipos de crustinas do Tipo I em *L. vannamei*: LvCrus Ia (10 sequências) e LvCrus Ib (2 sequências). Os dois subtipos compartilharam uma alta identidade aminoacídica (>80%) e uma estrutura condizente com as crustinas do Tipo I: um peptídeo sinal seguido de um peptídeo maduro contendo doze resíduos de cisteína, oito dos quais compoem o domínio conservado WAP (*Whey Acidic Protein*), característico desses AMPs. As análises moleculares mostraram um ponto isoeletrico teórico de 5,01-5,64 para LvCrus Ia (massa molecular de 9,6 kDa) e 7,66 para LvCrus Ib (massa molecular de 11,5 kDa). A expressão de crustinas do Tipo I mostrou um perfil similar de expressão em diferentes tecidos dos animais após um estímulo bacteriano. Interessantemente, LvCrus Ia e LvCrus Ib mostraram-se altamente expressos nas brânquias de animais estimulados e não estimulados, mas não nos hemócitos que são as células imunocompetentes de camarões. Para fins comparativos, a distribuição das demais crustinas de *L. vannamei* também foi investigada. As crustinas do Tipo II (IIa e IIb) mostraram uma distribuição idêntica, estando presentes em hemócitos e brânquias e as crustinas dos Tipos III e IV foram unicamente hemocitárias. Os níveis transcricionais de

LvCrus Ia foi analisado no intestino médio de animais 48 horas após uma infecção experimental por dois patógenos de camarões: o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) ou a bactéria *Vibrio harveyi*. A expressão de *LvCrus Ia* apresentou um aumento superior a 50 vezes em animais inoculados com água do mar estéril e com a bactéria *V. harveyi*, mas não houve diferença entre esses dois tratamentos. Analogamente, não houve modulação na expressão de *LvCrus Ia* após o desafio viral. Nos hemócitos, apenas as crustinas do Tipo IV (*LvSLPI*) foram induzidas após a infecção bacteriana. As crustinas do Tipo I de camarões peneídeos compõem, portanto, um grupo diverso de AMPs tanto em termos de estrutura primária, características bioquímicas e no perfil de expressão gênica. Ademais, este trabalho representa o primeiro relato de crustinas aniônicas e de um grupo de AMPs não hemocitários em *L. vannamei*.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos (AMPs), peptídeos antimicrobianos aniônicos (AAMPs), sistema imune de invertebrados, Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), *Vibrio harveyi*.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are essential molecules of the immune system of different organisms, participating effectively in the combat to a wide range of pathogenic microorganisms. In shrimp, four main AMP families were described, including the crustins. This AMP family is largely distributed among crustaceans and displays both antimicrobial and antiproteolytic activities. Crustins are classically divided in 5 groups, referred as Types I to V. In *L. vannamei* shrimp, despite the report of crustins from Types II, III and IV, Type I crustins were not still identified in this species. In this context, the aim of the present study was to identify and characterize at molecular and transcriptional levels Type I crustins in *L. vannamei*. Sequences coding for Type I crustins were searched in non-annotated transcriptomic libraries from *L. vannamei* (available in GenBank), submitted to phylogenetic reconstructions for the confirmation of their authenticity and then used for the design of specific primers for gene expression analyses. Twelve sequences were identified in *L. vannamei* libraries by using as query 41 Type I crustin sequences from 22 crustaceans. Phylogenetic analysis indicated the presence, at least, of two Subtypes of Type I crustins in *L. vannamei*: LvCrus Ia (10 sequences from nerve cord libraries) e LvCrus Ib (2 sequences from hemocyte libraries). The two Subtypes shared a high amino acid identity (>80%) and a primary structure consistent with other Type I crustins: a leader sequence followed by a mature peptide containing twelve cysteine residues, eight of them comprising a conserved WAP (Whey Acidic Protein) domain, typical of this AMP family. Molecular analysis showed a theoretical isoelectric point of 5.01-5.64 for LvCrus Ia (molecular weight = 9.6 kDa) and 7.66 for LvCrus Ib (molecular weight = 11.5 kDa). The gene expression of both Type I crustins showed to be similar in the different tissues of bacterial-challenged shrimp. Interestingly, LvCrus Ia and LvCrus Ib showed to be highly expressed in gills of both stimulated and non-stimulated animals, but not in hemocytes that are the shrimp immunocompetent cells. For comparative purposes, the gene expression distribution of other *L. vannamei* crustins was also evaluated. The gene expression distribution of Type II crustins (IIa and IIb) were identical, which were detected in hemocytes and gills, whereas the expression of crustins from Types III and IV showed to be restrict to hemocytes. The transcriptional levels of LvCrus Ia were analyzed in the midgut at 48 hours after an experimental infection with two shrimp pathogens: the White Spot Syndrome Virus

(WSSV) or the Gram-negative *Vibrio harveyi*. The expression of LvCrus Ia increased more than 50-fold in seawater-injected shrimp and animals infected with *V. harveyi*, but no differences were observed between treatments. Besides, no differences in gene expression modulation were observed for LvCrus Ia in response to the viral infection. In hemocytes, only the expression of Type IV crustins (LvSLPI) was induced in response to the bacterial infection. Type I crustins from penaeid shrimp comprise a diverse group of AMPs in terms of primary structure, biochemical features and gene expression profile. Additionally, the present study represents the first report of anionic crustins and the first identification of non-hemocytic AMPs in *L. vannamei*.

Keywords: antimicrobial peptides (AMPs), anionic antimicrobial peptides (AAMPs), invertebrate immune system, White Spot Syndrome Virus (WSSV), *Vibrio harveyi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo dos principais mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos na superfície ou no interior de células bacterianas.....	2
Figura 2. Representação esquemática ilustrando a posição dos oito resíduos de cisteína conservados que formam o domínio WAP e as ligações dissulfeto envolvidas na formação do “ <i>four-disulfide core</i> ” (4-DSC).....	6
Figura 3. Representação esquemática da estrutura primária dos diferentes tipos crustinas descritas em crustáceos (Tipos I a IV) e insetos (Tipo V).....	8
Figura 4. Esquema ilustrativo do estímulo microbiano.....	15
Figura 5. Esquema ilustrativo das infecções experimentais virais e bacterianas.....	17
Figura 6. Escolha dos iniciadores específicos para amplificação das crustinas <i>LvCrus Ia</i> e <i>LvCrus Ib</i>	22
Figura 7. Sequências aminoacídicas deduzidas das crustinas do Tipo I identificadas em <i>Litopenaeus vannamei</i>	27
Figura 8. Cladograma resultante do alinhamento da região compreendida entre os 12 resíduos conservados de cisteína dos diferentes Tipos de crustinas (Tipos I a V).	30
Figura 9. Assinatura aminoacídica das crustinas do Tipo I de crustáceos decápodes.	31
Figura 10. Alinhamento das sequências nucleotídicas e aminoacídicas das 10 sequências de <i>LvCrus Ia</i> identificadas.....	34
Figura 11. Alinhamento das sequências nucleotídicas e aminoacídicas das 2 sequências de <i>LvCrus Ib</i> identificadas.	38
Figura 12. Perfil de migração do RNA total das amostras (<i>pools</i> de 3 camarões) dos oito tecidos/órgãos das duas condições experimentais (não manipulados e estimulados com a bactéria <i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126).	41
Figura 13. Análise semi-quantitativa da distribuição da expressão de crustinas em oito tecidos/órgãos de camarões após 48 h de um estímulo microbiano em comparação a animais não estimulados.....	42

Figura 14. Curvas de dissociação e eficiência dos iniciadores utilizados para a amplificação das crustinas de <i>Litopenaeus vannamei</i>	44
Figura 15. Coeficiente de estabilidade dos candidatos à referência.	45
Figura 16. Perfil de expressão gênica de <i>LvCrus Ia</i> no intestino médio de <i>Litopenaeus vannamei</i> após 48 h de uma infecção experimental com a bactéria Gram-negativa <i>Vibrio harveyi</i> ou com o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV).	46
Figura 17. Perfil de expressão gênica das crustinas <i>LvCrustin</i> , <i>LvCrustin-like</i> , <i>LvSWD</i> e <i>LvSLPI</i> nos hemócitos de <i>Litopenaeus vannamei</i> após 48 horas de uma infecção experimental com a bactéria Gram-negativa <i>Vibrio harveyi</i> ou com o vírus da Síndrome da Mancha Branca	48

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Famílias de peptídeos antimicrobianos (AMPs) caracterizadas em camarões peneídeos. 4
- Quadro 2.** Sequências de crustinas do Tipo I de diferentes espécies de crustáceos utilizadas como query para a busca de sequências homólogas em bancos de dados de EST não anotados de *Litopenaeus vannamei*. . 21

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequências dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica..... 23
- Tabela 2.** Parâmetros bioquímicos de crustinas de diferentes espécies de crustáceos decápodes..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS

4-DSC	<i>Four-Disulfide Core</i>
AAMPs	Peptídeos antimicrobianos aniônicos
ALF	Fatores anti-lipopolissacarídeos
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
CAMPs	Peptídeos antimicrobianos catiônicos
CFU	Unidades formadoras de colônia
Cq	Ciclo de quantificação
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatados
DWD	Proteínas contendo dois domínios WAP (<i>Double WAP Domain</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EST	Etiqueta de sequência expressa (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
kDa	kilodaltons
LPS	Lipopolissacarídeos
MAS	Solução de Alsever modificada
pb	Pares de base
RNAi	RNA de interferência
RT-TDPCR	Transcrição reversa seguida de PCR <i>touchdown</i>
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real
SLPI	Inibidores de Proteases Secretados por Leucócitos (<i>Secretory Leukocyte Protease Inhibitors</i>)
SWD	Proteínas contendo um domínio WAP (<i>Single WAP Domain</i>)
Tm	Temperatura de desnaturação (<i>melting temperature</i>)
WAP	<i>Whey Acidic Protein</i>
WSSV	Vírus da Síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE	13
3. OBJETIVOS	13
3.1. OBJETIVO GERAL.....	13
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. ANIMAIS	14
4.2. ESTÍMULO MICROBIANO E COLETA DOS TECIDOS	14
4.3. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS VIRAIS E BACTERIANAS.....	16
4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA.....	18
4.5. ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	19
4.6. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR <i>TOUCHDOWN</i>	20
4.7. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	24
5. RESULTADOS	26
5.1. IDENTIFICAÇÃO DE CRUSTINAS DO TIPO I EM <i>L. vannamei</i>	26
5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS CRUSTINAS DO TIPO I DE <i>L. vannamei</i>	31
5.3. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	39
5.4. PERFIL TRANSCRICIONAL DE CRUSTINAS FRENTE A INFECÇÕES VIRAIS E BACTERIANAS	43
6. DISCUSSÃO	49

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	58
7.1. CONCLUSÕES.....	58
7.2. PERSPECTIVAS	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

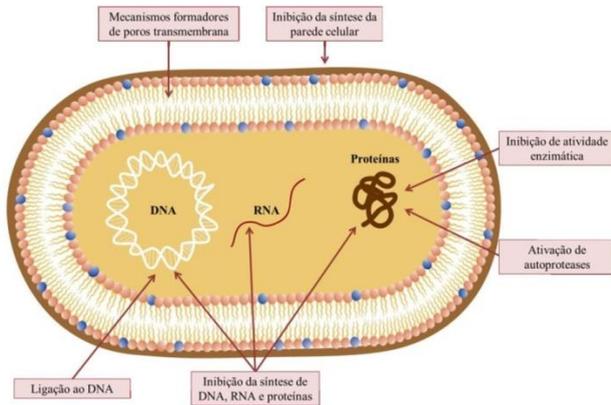
As proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial Proteins/Peptides* ou AMPs) são importantes agentes imunoefetores encontrados em uma ampla variedade de formas de vida, categorizando-se como componentes evolutivamente conservados do sistema imune inato de diversos organismos (HANCOCK; DIAMOND, 2000). Essas moléculas foram descritas em representantes de todos os reinos da vida, de bactérias a mamíferos, incluindo fungos e plantas (GUANÍ-GUERRA *et al.*, 2010). Em função de sua potente atividade antimicrobiana, os AMPs podem conferir uma proteção essencial contra uma série de microrganismos patogênicos e oportunistas atuando como verdadeiros protagonistas nas respostas de defesa, especialmente naqueles organismos que não possuem um sistema imunológico adaptativo, como os invertebrados (BULET; STOCKLIN; MENIN, 2004). Devido à sua rápida e eficiente atuação no sistema imune, os AMPs são, por vezes, referidos como “antibióticos naturais”, eliminando prontamente agentes invasores como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras, fungos filamentosos e, em menor grau, protozoários e até vírus envelopados (BULET; STOCKLIN; MENIN, 2004; GUANÍ-GUERRA *et al.*, 2010).

Os AMPs são classicamente descritos como polipeptídeos catiônicos (<10 kDa), anfipáticos, com tamanho entre 15 e 100 resíduos de aminoácidos e que diferem consideravelmente em sua sequência aminoacídica e arranjo espacial (ROSA; BARRACCO, 2010). A natureza anfipática dessas moléculas advém de sua composição aminoacídica, rica em resíduos hidrofóbicos e catiônicos, influenciando sobremaneira no modo como atuam sobre os microrganismos.

Os AMPs podem rapidamente se difundir até o ponto de infecção (BROGDEN, 2005), sendo capazes de eliminar efetivamente microrganismos em uma escala de concentração micromolar (ZASLOFF, 1992). Diferentes modos de ação foram sugeridos para explicar sua potente atividade antibacteriana (BROGDEN, 2005). Em geral, os AMPs atuam em nível de membrana, promovendo predominantemente a sua desestabilização através da formação de poros. Nesse mecanismo, as porções catiônicas do peptídeo interagem com as cargas negativas das membranas bacterianas de modo que, após essa primeira interação eletrostática, sua porção hidrofóbica insere-se na bicamada lipídica, promovendo sua permeabilização (GUANÍ-GUERRA *et al.*, 2010). Além desse, mecanismos de ação intracelular

foram sugeridos para os AMPs, onde estes podem ser internalizados para o citoplasma dos microrganismos, atuando sobre alvos específicos e promovendo a inibição de funções metabólicas importantes, como síntese da parede celular, síntese proteica e de ácidos nucleicos (**Figura 1**).

Figura 1. Esquema ilustrativo dos principais mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos na superfície ou no interior de células bacterianas.



Adaptado de (BRODGEN, 2005).

Uma vez que essas moléculas atuam sobre componentes essenciais de microrganismos, o desenvolvimento de uma resistência associada é consideravelmente menor (BROGDEN, 2005). Além disso, muitos AMPs apresentam uma grande especificidade para células procarióticas e baixa toxicidade para células eucarióticas. É por essa razão que tais moléculas abarcam um grande potencial biotecnológico no sentido de se destacarem como importantes candidatos para exploração no desenvolvimento de fármacos como novos antibióticos (ZASLOFF, 1992).

Em crustáceos, algumas famílias de AMPs foram descritas, as quais são produzidas principalmente pelas células circulantes de defesa, conhecidas como hemócitos, e secretadas para o sistema circulatório (hemolinfa). Por razões econômicas, essas moléculas foram mais bem caracterizadas em espécies de interesse comercial, tais como camarões peneídeos e algumas espécies de caranguejo, lagosta e lagostim (ROSA; BARRACCO, 2010). Atualmente, quatro diferentes famílias de AMPs

codificadas por genes foram reportadas em camarões peneídeos, a saber: as peneidinas (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997), os fatores antilipopossacarídeos (ALFs) (GROSS; BARTLETT; BROWDY, 2001), as crustinas (BARTLETT *et al.*, 2002) e as stylicinas (ROLLAND *et al.*, 2010) (**Quadro 1**).

As crustinas são basicamente definidas como pequenos polipeptídeos antimicrobianos (7-14 kDa) catiônicos e anfipáticos contendo um domínio WAP (*Whey Acidic Protein*) na extremidade C-terminal (SMITH *et al.*, 2008). O primeiro membro descrito dessa família foi um peptídeo de 11,5 kDa isolado dos hemócitos do caranguejo *Carcinus maenas* e, posteriormente, designado como “Carcinina” (RELF; CHISHOLM, 1999). Sequências homólogas à Carcinina foram posteriormente identificadas em camarões peneídeos (*Litopenaeus vannamei* e *Litopenaeus setiferus*) e denominadas como “Crustinas” (BARTLETT *et al.*, 2002). A partir desse trabalho, o termo “Crustina” passou a ser universalmente utilizado para a descrição dessas moléculas em outras espécies de crustáceos (SMITH *et al.*, 2008).

Quadro 1. Famílias de peptídeos antimicrobianos (AMPs) caracterizadas em camarões peneídeos.

AMP	variant	MW in kDa (charge)	functions	structural domains	3D structure
penaeidins	PEN1/2	4.71 – 6.12 (cationic)	anti-Gram-positive antifungal anti-tumour		 Livan PEN3 [PDB: 1UE0]
	PEN3	5.58 – 7.24 (cationic)	anti-Gram-positive antifungal chitin-binding β-integrin-mediated cytokine property		
	PEN4	5.23 – 5.37 (cationic)	anti-Gram-positive antifungal		
	PEN5	6.42 – 6.45 (cationic)	antibacterial antifungal antiviral		
ALFs	ALF-A	11.4 – 11.5 (anionic and cationic)	antibacterial antifungal		 ALFPm3 [PDB: 2J08]
	ALF-B	10.6 – 11.2 (cationic)	antibacterial antifungal antiviral LPS- and LTA-binding control of haemolymph microbiota		
	ALF-C	11 – 11.3 (cationic)	antibacterial antiviral LPS neutralizing control of haemolymph microbiota		
	ALF-D	10.7 – 10.8 (anionic)	not determined		
	ALF-E	11.4 – 12.5 (anionic and cationic)	antibacterial		
custins	Type I	9.34 – 17.79 (anionic and cationic)	anti-Gram-negative bacterial-binding bacterial clearance haemocyte phagocytosis antiprotease		not determined
	Type II	11.22 – 22.45 (cationic)	anti-Gram-positive LPS- and LTA-binding inhibition of viral propagation bacterial agglutination antibacterial defence		
	Type III	5.96 – 7.40 (cationic)	anti-Gram-positive bacterial-binding antiprotease		
	Type IV	10.93 – 11.14 (cationic)	bacterial-binding antiprotease		
stylicins	1	8.9 (anionic)	antifungal LPS-binding bacterial agglutination		not determined
	2		not determined		



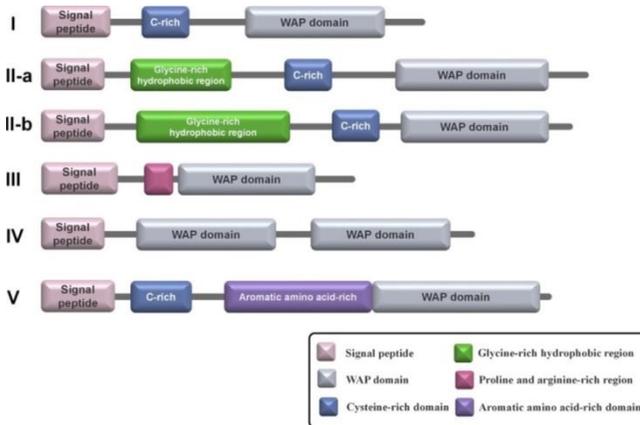
AMP: peptídeos antimicrobianos; MW: Massa molecular; kDa: kilodaltons.
 Reproduzido de (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016).

Todas as crustinas contêm uma sequência sinal na extremidade N-terminal e um domínio WAP altamente conservado na região C-terminal (SMITH *et al.*, 2008). O domínio WAP é constituído usualmente por 50 resíduos aminoacídicos onde são encontrados oito resíduos conservados de cisteína engajados em quatro ligações dissulfeto, gerando um arranjo tridimensional característico descrito no PROSITE como *four-dissulfide core* (4-DSC) (RANGANATHAN; SIMPSON, 1999) (**Figura 2**). No entanto, o domínio WAP não está presente unicamente em crustinas. Na verdade, o termo “WAP” deriva do nome dado a uma família de proteínas inicialmente descritas no soro do leite de mamíferos roedores (HENNIGHAUSEN; SIPPEL, 1982) e envolvidas, possivelmente, na inibição de proteases. Desde então, proteínas contendo um ou mais domínios WAP foram identificadas em uma ampla variedade de organismos, incluindo vertebrados e, em menor extensão, em invertebrados, desempenhando as mais diversas funções biológicas como inibição de proteases, regulação da diferenciação tecidual e, em alguns casos, atividade antimicrobiana (SMITH *et al.*, 2011). Atualmente, mais de 7.700 sequências nucleotídicas correspondentes a “WAP domain” em animais estão depositadas em bancos de dados públicos ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=\(WAP+domain\)+AND+%22animals%22](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=(WAP+domain)+AND+%22animals%22)), das quais 76% correspondem a sequências de 221 espécies de vertebrados, principalmente mamíferos placentários. Das sequências de invertebrados, a maior parte advém de artrópodes e nematódeos, em especial os insetos que totalizam 892 sequências oriundas de 90 espécies.

principalmente em camarões peneídeos (Subordem Dendrobranchiata) e muito raramente em crustáceos pleociemados, como no lagostim *Pacifastacus leniusculus* e no caranguejo *Paralithodes camtschaticus* (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2007; SPERSTAD *et al.*, 2009).

As crustinas do Tipo III, por sua vez, apresentam apenas o domínio WAP em sua estrutura, sendo desprovidas dos demais domínios encontrados nas crustinas do Tipo I e II. Esse tipo de crustina também é referido como “proteínas contendo domínio WAP” (*Single WAP Domain proteins* ou SWD), podendo ou não conter um domínio rico em resíduos de prolina e/ou arginina na sua extremidade N-terminal (**Figura 3**). Crustinas do Tipo III foram descritas em camarões peneídeos e no lagostim *Procambarus clarkii* (AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, 2008; DU *et al.*, 2010). As crustinas do Tipo IV são moléculas contendo dois domínios WAP (*Double WAP Domain proteins* ou DWD) identificadas em camarões (CHEN; HE; XU, 2008; DU *et al.*, 2009) e caranguejos (LI *et al.*, 2012, 2013), exibindo atividades antimicrobianas e antiproteolíticas (**Figura 3**). Apesar da diferença no padrão estrutural observado nas demais crustinas, esses peptídeos foram definidos como um quarto grupo dentro dessa família (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). Ainda, com base em análises genômicas comparativas, Zhang & Zhu (2012) identificaram um novo Tipo de crustinas, muito similares às crustinas do Tipo I de crustáceos, referidas como um quinto grupo (Crustinas Tipo V) e caracterizadas por um domínio rico em resíduos de aminoácidos aromáticos adjacente ao domínio WAP. Esse tipo está presente unicamente em insetos (Ordem Hymenoptera) (**Figura 3**).

Figura 3. Representação esquemática da estrutura primária dos diferentes tipos de crustinas descritas em crustáceos (Tipos I a IV) e insetos (Tipo V).



Reproduzido de (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015).

As crustinas podem apresentar uma atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (Tipos I, II e III), Gram-negativas (Tipo IIb e algumas crustinas do Tipo III) e fungos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*), atuando ainda como inibidores de protease (Tipos III e IV) (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). Contudo, estudos *in vitro* apontam que sua atuação é marcadamente superior sobre bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas (RELF; CHISHOLM, 1999; SUPUNGUL *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2007). Atividade antiproteolítica, de modo similar a outras proteínas que contêm domínio WAP, foi reportada unicamente nas crustinas dos Tipos III (AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, 2008; DU *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2014) e IV (CHEN; HE; XU, 2008; DU *et al.*, 2009). Amparyup *et al.* (2008) demonstraram uma forte inibição da protease bacteriana subtilisina A pela crustina recombinante do Tipo III do camarão *Penaeus monodon* (rSWDFm2). A crustina rSWDFc do camarão *Fenneropenaeus chinensis* exibiu uma atividade inibitória sobre as proteases subtilisina A, proteinase K e tripsina (JIA *et al.*, 2008). Até o presente, crustinas do Tipo IV de camarões foram reportadas exibindo apenas atividade

inibidora de protease (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). De fato, nenhuma atividade antibacteriana foi observada na crustina rFcDWD do camarão *F. chinensis* (DU *et al.*, 2009) e na crustina recombinante rMjDWD do camarão *Marsupenaeus japonicus* (CHEN; HE; XU, 2008).

O cultivo de camarões, conhecido como carcinicultura, representa uma atividade de grande importância econômica em diversos países, movimentando grandes volumes de capital. No entanto, um dos maiores desafios para essa atividade é a presença de doenças que inviabilizam a produção, podendo trazer prejuízos irremediáveis. Estima-se que, nos últimos 15 anos, as perdas globais no panorama da aquicultura mundial, decorrentes de surtos de doenças, tenham alcançado a marca dos US\$ 15 bilhões (BOSTOCK *et al.*, 2010; FLEGEL, 2012). Entre os principais agentes causadores de enfermidades em camarões encontram-se as bactérias do gênero *Vibrio* spp., fungos filamentosos do gênero *Fusarium* spp. e várias espécies de vírus, especialmente aquelas causadoras da Síndrome da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (BACHERE *et al.*, 2004; LIGHTNER *et al.*, 2012), sendo essa última a responsável pelo maior número de perdas na produção.

O camarão *L. vannamei*, também conhecido como camarão branco do Pacífico, é a espécie de peneídeo mais cultivada no mundo (FAO, 2012) e, por essa razão, os estudos relacionados às suas respostas imunes, incluindo a caracterização de AMPs, são importantes para a viabilização de uma carcinicultura sustentável através do desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção e controle de enfermidades (ROSA; BARRACCO, 2010). Em *L. vannamei*, foram reportadas crustinas do Tipo II (SHOCKEY *et al.*, 2009), Tipo III (DU; YUAN; REN, 2015; JIMÉNEZ-VEGA *et al.*, 2004) e do Tipo IV (JIMÉNEZ-VEGA; VARGAS-ALBORES, 2007). VARGAS-ALBORES *et al.* (2004) descreveram nessa espécie duas crustinas do Tipo II cuja sequência aminoacídica difere em apenas uma alteração pontual no resíduo 108: a substituição de uma isoleucina (LvCrustin I) por uma prolina (LvCrustin P). Interessantemente, o perfil transcricional observado para essas duas isoformas diferiu em camarões desafiados com a bactéria *Vibrio alginolyticus*, onde a isoforma I apresentou redução nos níveis de expressão enquanto a isoforma P não foi modulada. Isso indica que essas diferenças estruturais causam alterações no perfil transcricional dessas duas isoformas, que podem atuar de maneiras distintas. A participação *in vivo* de crustinas do Tipo II na

resposta de *L. vannamei* à infecção experimental com a bactéria *Vibrio penaeicida* e com o fungo *Fusarium oxysporum*, investigada via silenciamento pós-transcricional por RNA de interferência (RNAi), mostrou-se fundamental, onde um aumento considerável na susceptibilidade dos camarões silenciados foi observado frente à infecção bacteriana, sugerindo um papel essencial desse AMP na sobrevivência desses animais (SHOCKEY *et al.*, 2009).

As crustinas do Tipo III foram primeiramente identificadas em *L. vannamei* através de uma abordagem transcriptômica em bancos hemocitários. JIMÉNEZ-VEGA *et al.* (2004) isolaram, pela primeira vez em invertebrados, transcritos codificantes para uma proteína contendo unicamente um domínio WAP em sua estrutura primária e, por essa razão, foram chamadas Single WAP Domain ou SWD. A sequência aminoacídica deduzida possui uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e arginina e apresenta uma alta identidade com outras proteínas que contém domínio WAP presentes em vertebrados, tais como a *chelonianin*, descrita na tartaruga *Caretta caretta* e as proteínas SLPI (*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) e *elafin* descritas em humanos. A participação de SWD nas respostas de defesa de *L. vannamei* foi sugerida após uma infecção experimental com a bactéria Gram-negativa *V. alginolyticus*, onde um aumento nos níveis transcricionais foi observado 3 e 6 horas após o desafio bacteriano, retornando aos níveis basais gradativamente após 12 horas do inóculo. No entanto, sua atuação na imunidade antimicrobiana não foi investigada, embora uma atividade antiproteolítica pudesse estar potencialmente envolvida de maneira similar a outras proteínas que contém domínio WAP descritas na literatura. A possível participação das crustinas do Tipo III nos mecanismos de defesa de *L. vannamei* só foi demonstrada anos mais tarde através de investigações *in vitro* (DU; YUAN; REN, 2015). DU *et al.* (2015) expressaram em sistema heterólogo uma isoforma da proteína SWD, identificada em hemócitos e, então, denominada *LvSWDi*, para investigar seu envolvimento na imunidade antibacteriana de *L. vannamei*. A proteína recombinante *rLvSWDi* apresentou potente atividade antiproteolítica sobre proteases secretadas pela bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* e mostrou também uma alta capacidade aderente sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sugerindo que o contato inicial com a superfície dos microrganismos seja um passo importante para a atividade antimicrobiana dessas proteínas. Além da caracterização funcional, análises transcricionais mostraram que a expressão de *LvSWDi* é

modulada frente a infecções bacterianas experimentais, onde um aumento de aproximadamente 6 vezes nos níveis transcricionais em relação aos animais não manipulados foi observado 12 horas após um desafio experimental com a bactéria *V. anguillarum*. Apesar da caracterização funcional de *LvSWDi*, a participação efetiva das crustinas do Tipo III na imunidade de *L. vannamei* ainda não foi completamente esclarecida e apenas suposições baseadas em estudos *in vitro* apontam sua atuação como importantes efetores imunológicos.

Crustinas do Tipo IV foram descritas inicialmente em *L. vannamei* como proteínas similares aos inibidores de proteases secretados por leucócitos humanos (*SLPI-like proteins*) (SLPI, do inglês *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*), em virtude de sua estrutura primária contendo unicamente dois domínios WAP (JIMÉNEZ-VEGA; VARGAS-ALBORES, 2007). As sequências codificantes para essas proteínas foram identificadas em bancos transcriptômicos de hemócitos e caracterizadas unicamente em sua natureza molecular e transcricional. *LvSLPI* possui um peptídeo maduro catiônico de 10,9 kDa (100 resíduos aminoácídicos) contendo 16 resíduos de cisteína específicos que formam possivelmente dois domínios WAP (DWD, do inglês *Double WAP Domain*). Embora essa arquitetura molecular seja atualmente encontrada em outras DWD descritas em crustáceos (CHEN; HE; XU, 2008; DU et al., 2009; LI et al., 2012, 2013; SUTHIANTHONG et al., 2011), JIMÉNEZ-VEGA & VARGAS-ALBORES (2007) forneceram o primeiro relato de uma DWD em invertebrados, abrindo um interessante caminho de investigação do papel dessas proteínas no sistema imune desses animais. De maneira interessante, a análise do perfil transcricional de *LvSLPI* em animais experimentalmente desafiados com a bactéria *V. alginolyticus* revelou um aumento nos níveis transcricionais após 3 horas da infecção que retornou aos níveis basais 24 horas após o inóculo, sugerindo que essa aparente modulação na expressão de *LvSLPI* pode representar um forte indício de seu papel imunoeletor, atuando possivelmente no controle proteolítico das reações de defesa.

Embora um diverso repertório de crustinas tenha sido identificado em *L. vannamei*, ainda não há conhecimento sobre a presença de crustinas do Tipo I nessa espécie. Crustinas do Tipo I, presentes predominantemente em caranguejos, lagostas e lagostins, foram apenas muito recentemente reportadas em camarões penéideos, a saber: *P. monodon* (DONPUDSA et al., 2014) e *M. japonicus* (JIANG et al., 2015; LIU et al., 2015b), atuando como potentes agentes

antimicrobianos e, inclusive, como promotores de fagocitose. Nesse sentido, considerando que as crustinas desempenham uma função primordial no sistema de defesa do camarão *L. vannamei*, impedindo o estabelecimento de infecções, especialmente de natureza bacteriana, a identificação e caracterização das crustinas do Tipo I se tornam indispensáveis para uma compreensão mais holística da diversidade molecular dessa família de AMPs, abrindo novos rumos para a investigação de possíveis funções adicionais e propiciando uma compreensão mais acurada de como o hospedeiro utiliza sua artilharia imunológica no combate a microrganismos patogênicos.

2. HIPÓTESE

As crustinas do Tipo I do camarão *Litopenaeus vannamei* são constitutivamente expressas nos hemócitos e são moduladas frente a infecções bacterianas e virais.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar, em nível molecular e transcricional, sequências codificantes para crustinas do Tipo I no camarão *Litopenaeus vannamei*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar sequências codificantes para crustinas do Tipo I em bancos transcriptômicos de *L. vannamei*;
- Verificar a distribuição da expressão gênica de crustinas em diferentes tecidos/órgãos de camarões após um desafio bacteriano;
- Caracterizar o perfil de expressão gênica das crustinas de *L. vannamei* frente a infecções experimentais com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) ou com a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* (10 ± 1 g), de ambos os sexos, foram cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura (UFSC/CCA/LCM) e mantidos no Setor de Aquários do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA). Os animais foram aclimatados por um período mínimo de 7 dias em tanques contendo aproximadamente 100 L de água salgada (com aeração constante e renovação diária da água de 50%) e alimentados uma vez ao dia com ração comercial (Guabi; POTIMAR 35 EXT) a uma biomassa de 2% do peso corporal. A temperatura do ar foi mantida a 26°C, sendo que a temperatura da água permaneceu a 23°C durante os experimentos.

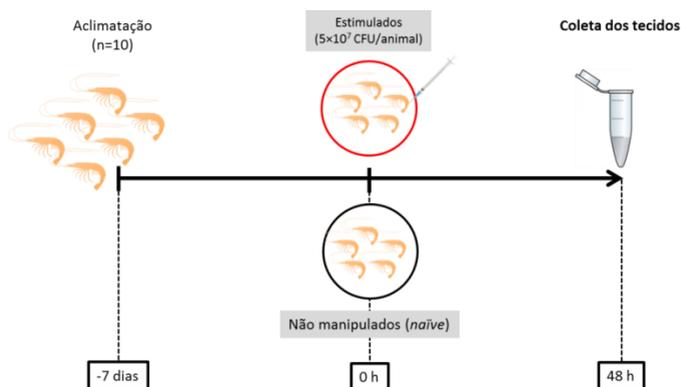
4.2. ESTÍMULO MICROBIANO E COLETA DOS TECIDOS

Para o estímulo microbiano, foi utilizada a bactéria marinha Gram-negativa *Vibrio harveyi* ATCC 14126. A cultura de *V. harveyi* foi crescida em meio LB-NaCl (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 3% NaCl, pH 7,2) a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 12-16 h sob agitação (150 rpm). Em seguida, a cultura bacteriana foi centrifugada ($1.000 \times g$ por 10 min) e suspensa em água do mar filtrada ($0,45 \mu\text{m}$). A concentração bacteriana foi ajustada espectrofotometricamente (Biowave II WPA[®]) para a densidade óptica $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,52$, correspondente a 5×10^8 unidades formadoras de colônias (*Colony-Forming Units* ou CFU) por mL. As bactérias foram então inativadas por calor a 70°C por 20 min e plaqueadas em meio LB-NaCl ágar (LB-NaCl acrescido de 1,5% de ágar) para confirmação da eficiência do tratamento. Os animais ($n=10$) foram aclimatados por 7 dias. Em seguida, foram injetados intramuscularmente, entre o primeiro e o segundo segmentos da região dorsal dos camarões ($n=5$), $100 \mu\text{L}$ da solução contendo as bactérias mortas (5×10^7 CFU/animal). Como controle, foram utilizados animais não manipulados (grupo *naïve*; $n=5$) (**Figura 4**).

Após 48 h da injeção, a hemolinfa dos 5 animais de cada grupo foi coletada e agrupada em uma única amostra por condição. Extraiu-se a hemolinfa pela região ventral do abdome, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, por inserção de uma agulha ($13 \times 0,4$ mm) acoplada a uma seringa estéril de 1 mL. A hemolinfa foi

coletada na presença de solução anticoagulante (Solução de Alsever Modificada ou MAS: 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) (1:2; hemolinfa:MAS), centrifugada ($1.500 \times g$ por 10 min a 4°C) e o precipitado celular suspenso em 1 mL do reagente TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]). Após a extração da hemolinfa, os camarões foram anestesiados por hipotermia (-20°C por 20 min) e posteriormente sacrificados para a dissecação e coleta dos seguintes tecidos/órgãos: estômago, hepatopâncreas, intestino médio, intestino posterior, músculo, brânquias e cordão nervoso. Após a coleta, os tecidos foram lavados em solução Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4) e macerados na presença de 1 mL do reagente TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]) com o auxílio de pistilos estéreis acoplados ao homogeneizador VWR[®] Disposable Pellet Mixers and Cordless Motor. Após centrifugação ($12.000 \times g$ por 10 min a 4°C), os sobrenadantes foram coletados e conservados a -20°C para a posterior extração de RNA total (item 4.4.).

Figura 4. Esquema ilustrativo do estímulo microbiano.



-7 dias: período de aclimação dos animais. **0 h:** estímulo microbiano. **48 h:** coleta dos tecidos/órgãos e processamento das amostras. Círculo vermelho: grupo estimulado com *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (bactérias inativadas por calor); Círculo preto: animais não manipulados (grupo *naïve*).

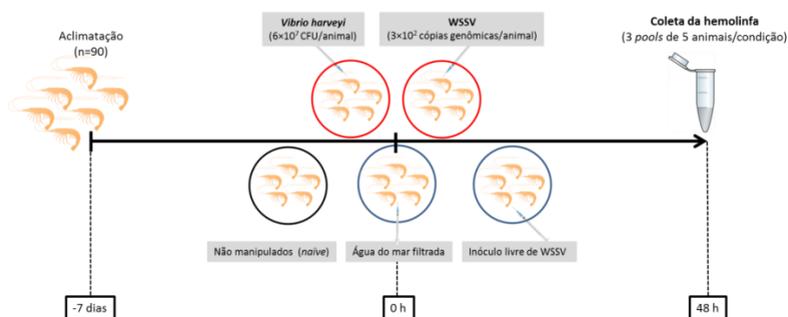
4.3. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS VIRAIS E BACTERIANAS

Para os ensaios de infecção viral, foi utilizado o vírus causador da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Para o preparo do inóculo viral, 10 g de tecido muscular (abdome) de camarões diagnosticados positivos para o WSSV, foram homogeneizados em tampão Tris-NaCl estéril e gelado (1:10; p:v) e centrifugados ($3.000 \times g$ por 30 min a $4^{\circ}C$). O sobrenadante foi recuperado e centrifugado ($12.000 \times g$ por 40 min a $4^{\circ}C$), filtrado ($0,45 \mu m$) e armazenado em nitrogênio líquido (GONCALVES *et al.*, 2014). Seguindo a mesma metodologia, foi preparado um inóculo livre de WSSV, utilizando tecido muscular de animais diagnosticados como negativos para o vírus. Após um período de aclimação de 7 dias, os animais foram injetados intramuscularmente (n=15), entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais da região dorsal, com $100 \mu L$ do inóculo viral (3×10^2 cópias genômicas/animal). Essa dose viral foi anteriormente padronizada em nosso laboratório, a qual é capaz de matar 50% dos animais (DL_{50}) num período de 5-7 dias. Após a injeção, os camarões foram dispostos em tanques contendo 16 L de água salgada (5 animais por tanque) com renovação diária de 50%. Os camarões ficaram sem alimentação nas 48 h seguintes, quando foi realizada a coleta da hemolinfa (3 *pools* de 5 animais) e da porção medial do intestino (3 *pools* de 5 animais), segundo descrito no item 4.2. Os hemócitos obtidos por centrifugação ($1.500 \times g$ por 10 min a $4^{\circ}C$) e os intestinos médios coletados foram homogeneizados em 1 mL do reagente TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]) para a posterior extração de RNA total (item 4.4.). Como controle, foram utilizados animais não manipulados (grupo *naïve*; n=15) e animais injetados com $100 \mu L$ do inóculo livre de WSSV (n=15) (**Figura 5**). Assim como realizado para o grupo experimental, as amostras de hemócitos e intestino médio dos dois grupos controle foram preparadas na forma de 3 *pools* de 5 animais.

Para os ensaios de infecção bacteriana, foi utilizada a bactéria *V. harveyi* ATCC 14126. Os camarões foram aclimatados por 7 dias e, logo após, injetados intramuscularmente (n=30), entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais da região dorsal, com $100 \mu L$ do inóculo bacteriano vivo (6×10^7 CFU/animal) em água do mar filtrada. Essa dose bacteriana foi anteriormente padronizada no nosso laboratório, a qual é capaz de matar 50% dos animais (DL_{50}) num período de 48 h. Após a infecção, os camarões foram dispostos em tanques contendo 16 L de

água salgada (5 animais por tanque) com renovação diária de 50%. Os camarões ficaram sem alimentação nas 48 h seguintes, quando foi realizada a coleta da hemolinfa (3 *pools* de 5 animais) e da porção medial do intestino (3 *pools* de 5 animais), segundo descrito no item 4.2. Os hemócitos obtidos por centrifugação ($1.500 \times g$ por 10 min a $4^{\circ}C$) e os intestinos médios coletados foram homogeneizados em 1 mL do reagente TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]) para a posterior extração de RNA total (item 4.4.). Animais não manipulados (grupo *naïve*; n=15) e injetados com 100 μL de água do mar filtrada (n=15) foram utilizados como controle (**Figura 5**). Assim como realizado para o grupo experimental, as amostras de hemócitos e intestino médio dos dois grupos controle foram preparadas na forma 3 *pools* de 5 animais.

Figura 5. Esquema ilustrativo das infecções experimentais virais e bacterianas.



-7 dias: início do período de aclimatação dos animais. **0 h:** infecção experimental. **48 h:** coleta dos tecidos (hemolinfa e intestino médio) e processamento das amostras. Círculos vermelhos: grupos experimentais (camarões infectados com o WSSV ou com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126); Círculos azuis: controles experimentais (animais injetados com inóculo livre de WSSV ou com água do mar filtrada); Círculo preto: animais não manipulados (grupo *naïve*). Para cada grupo experimental, foram feitos 3 *pools* de 5 animais.

4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

Para a obtenção do RNA total, as amostras conservadas em TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]) foram submetidas à extração com clorofórmio. Após centrifugação (12.000 ×g por 15 min a 4°C), o RNA total obtido foi precipitado com isopropanol e lavado 2 vezes com etanol 75% gelado. O precipitado de RNA foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases e tratado com 1 U da enzima DNase I (Thermo Scientific[®]) por 15 min a 37°C para a eliminação de DNA genômico contaminante. A enzima DNase I foi então inativada (70°C por 15 min) e as amostras precipitadas com 0,3 M acetato de sódio (pH 5,2) e isopropanol (1:1; v:v). Finalmente, o RNA foi lavado com etanol 75% gelado e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases a 70°C.

Para a avaliação da distribuição gênica, o RNA total foi extraído individualmente das 5 amostras dos 8 tecidos/órgãos coletados das 2 condições experimentais (animais estimulados e não manipulados). A concentração das amostras foi determinada pela leitura de absorbância em 260 nm ($A_{260\text{nm}} = 1$, equivalente a 40 µg RNA/mL) no espectrofotômetro NanoVue Plus[™]. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do RNA obtido, sendo a integridade das amostras avaliada em gel de agarose (0,8%). A partir dos resultados de pureza ($A_{260/280}$: $1,8 \geq 2,1$) e integridade (sem sinais visíveis de degradação em gel de agarose), as 3 melhores amostras de cada tecido/órgão (de cada condição) foram agrupadas em um único *pool*, utilizando a mesma quantidade de RNA total extraído (5 µg de cada amostra). Em seguida, as amostras dos *pools* de RNA foram re-quantificadas espectrofotometricamente e a integridade avaliada em gel de agarose (0,8%). As amostras de RNA total dos hemócitos e intestino médio (ambas coletadas em 3 *pools* de 5 animais por condição) das infecções experimentais virais e bacterianas foram diretamente processadas e a concentração, pureza e integridade avaliadas conforme anteriormente descrito.

Para a síntese de cDNA, 1 µg de RNA total foi reversamente transcrito na presença de 200 U da enzima RevertAid[®] Reverse Transcriptase (Thermo Scientific[®]), 0,5 mM de dNTP Mix (Sinapse Inc[®]), 20 U da enzima RiboLock[™] RNase Inhibitor (Thermo Scientific[®]) e 0,5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Sinapse Inc[®]), num volume final

de 20 μ L. As amostras foram incubadas a 42°C por 60 min e a enzima inativada por calor a 65°C por 15 min.

4.5. ANÁLISES *IN SILICO*

Sequências nucleotídicas codificantes para crustinas do Tipo I (n=41) obtidas de 22 espécies de crustáceos (**Quadro 2**) foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) para a busca de sequências homólogas em bancos de dados de EST (*Expressed Sequence Tags*) não anotados de *L. vannamei* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest?LinkName=taxonomy_nuce&from_uid=6689; 161.377 sequências – acesso entre 2015-2016) disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information). As buscas foram realizadas utilizando-se a ferramenta tBLASTx e as sequências resgatadas foram submetidas a uma análise de identidade utilizando-se a ferramenta BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para avaliar a similaridade aminoacídica com sequências de crustinas descritas. Apenas as sequências completas com coeficientes de identidade superiores a 50% e *e-value* inferior a 10^{-15} foram selecionadas. O programa Expsy Translate Tool (<http://web.expsy.org/translate/>) foi utilizado para a obtenção das sequências aminoacídicas deduzidas e o programa Expsy ProtParam Tool (<http://web.expsy.org/protparam/>) para a determinação de parâmetros bioquímicos como massa molecular e ponto isoelétrico teórico (pI). O programa SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) foi utilizado para prever a existência de peptídeo sinal, enquanto que o programa Conserved Domain Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) do NCBI foi utilizado para a busca de domínios proteicos conservados. Os alinhamentos das sequências foram gerados a partir do algoritmo ClustalW no programa BioEdit Sequence Alignment Editor® versão 5.0.9 (HALL, 1999). Por fim, os cladogramas foram construídos com auxílio do programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013) utilizando o método estatístico Neighbor Joining, com 1.000 replicatas. O modelo de substituição aminoacídica utilizado para estimar a divergência entre as sequências foi o modelo de Poisson, assumindo taxas de substituição uniformes entre todos os sítios aminoacídicos. Sítios contendo *gaps* entre as sequências foram desconsiderados previamente à reconstrução das árvores.

4.6. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR *TOUCHDOWN*

As análises semi-quantitativas de expressão gênica de crustinas do Tipo I nos diferentes tecidos/órgãos de animais juvenis foram realizadas por transcrição reversa seguida de PCR *touchdown* (RT-TDPCR). As reações de RT-TDPCR foram realizadas em um volume final de 15 μ L contendo 2 mM de $MgCl_2$, 0,4 mM de dNTP Mix, 0,4 μ M dos iniciadores senso e antisenso, 1 U da enzima *Taq* DNA Polymerase (Sinapse Inc[®]) e 1 μ L de cDNA (diluído 10 vezes). As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 s, hibridização a 70°C por 60 s (com diminuição de 1°C a cada ciclo), extensão a 72°C por 60 s e extensão final a 72°C por 7 min. Os iniciadores foram escolhidos em regiões de alta especificidade (**Figura 6**) e suas sequências estão apresentadas na **Tabela 1**. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo (Amresco[®]). Os tamanhos moleculares foram comparados com o padrão molecular de 100 pb (Sinapse Inc[®]). Como controle de expressão e de qualidade das amostras, foi avaliada a expressão do gene β -actina (**Tabela 1**) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, hibridização a 50°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. Os géis foram visualizados por fluorescência UV e digitalizados no programa DigiDoc-ItLS.

Quadro 2. Sequências de crustinas do Tipo I de diferentes espécies de crustáceos utilizadas como query para a busca de sequências homólogas em bancos de dados de EST não anotados de *Litopenaeus vannamei*.

Espécie	Tipo de Sequência	GenBank	Espécie	Tipo de Sequência	GenBank
PLEOCYEMATA			PLEOCYEMATA		
Astacidae			Portunidae		
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Nucleotídica	EF523612	<i>Carcinus maenas</i>	Nucleotídica	AJ427538
	Nucleotídica	EF523613	<i>Callinectes sapidus</i>	EST	CV462984
Cambaridae			<i>Portunus pelagicus</i>	Nucleotídica	EF120999
<i>Procambarus clarkii</i>	Aminoácídica	AEB54630		Aminoácídica	ABM65762
Lithodidae			<i>Portunus tritubercu</i>	Aminoácídica	ACM89167
<i>Paralithodes camtschaticus</i>	Nucleotídica	EU921643		Aminoácídica	ACO07303
Nephorpidae			<i>Scylla paramamosa</i>	Nucleotídica	EU161287
<i>Homarus americanus</i>	Nucleotídica	EF193003		Aminoácídica	ABY20728
	Aminoácídica	ABM92333	<i>Scylla serrata</i>	Aminoácídica	ADW11096
<i>Homarus gammarus</i>	Nucleotídica	AJ786653	DENDROBRANCHIATA		
	Aminoácídica	CAH10349	Penaeidae		
<i>Nephrops norvegicus</i>	Aminoácídica	CCE46015		Aminoácídica	<i>Mj Cru I-1*</i>
Oregoniidae				Aminoácídica	<i>Mj Cru I-2**</i>
<i>Hyas araneus</i>	Nucleotídica	EU921642	<i>Marsupenaeus japo</i>	Aminoácídica	<i>Mj Cru I-3**</i>
	Aminoácídica	ACJ06763		Aminoácídica	<i>Mj Cru I-4**</i>
Palaeonidae				Aminoácídica	<i>Mj Cru I-5**</i>
	Nucleotídica	JQ413342		Aminoácídica	ACP40176
	Nucleotídica	EF364561	<i>Penaeus monodon</i>	Aminoácídica	CarcininPm 1***
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Nucleotídica	EF364560		Aminoácídica	CarcininPm 2***
	Nucleotídica	EF364559	BRANCHIOPODA		
	Nucleotídica	EF364558	Artemiidae		
	Nucleotídica	FJ429308	<i>Artemia salina</i>	Nucleotídica	KF494236
Palinuridae			MAXILLOPODA		
<i>Panulirus argus</i>	Nucleotídica	AY340636	Calanidae		
Pandalidae			<i>Calanus finmarchici</i>	EST	EL585729
<i>Pandalopsis japonica</i>	Aminoácídica	AGU01540	AMPHIPODA		
	Aminoácídica	AFN80342	Gammaridae		
Varunidae			<i>Gammarus pulex</i>	EST	EH273178
<i>Eriocheir sinensis</i>	Nucleotídica	GQ200832			

Sequências de crustinas do Tipo I de 22 espécies de crustáceos foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) para a busca de sequências homólogas em bancos de dados públicos de *L. vannamei*. *LIU *et al.*, 2015b. **JIANG *et al.*, 2015. ***DONPUDSA *et al.*, 2014.

Figura 6. Escolha dos iniciadores específicos para amplificação das crustinas *LvCрус Ia* e *LvCрус Ib*.

```

          10      20      30      40      50
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] CAGTCAGTCGTCGCGCTTCGAGCTGTCAGTTACTTGCAACATGATGATTC
          60      70      80      90     100
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] -AGTCAGCAGTCGACTTTCGAGCTGTGAAGTCCTC-CGTCATGATGATTC
          110     120     130     140     150
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          160     170     180     190     200
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] AGCGGAAACGCTGACGGTGCAGATACTACTGCGGAGAAGTGGCGGCGGA
          210     220     230     240     250
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] GCGCGGACGCCGATGGTTGCAGGTATTACTGCAGGAAGTGGCGGCGGA
          260     270     280     290     300
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          310     320     330     340     350
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] CGCCTCCGAAAGCGAACAACACAGTGGAGGATGCCCGGACATTCGGCGTCAC
          360     370     380     390     400
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          410     420     430     440     450
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] GTAAACTCCCTGTT----TAAGA----GAG--GATTCATTCGCGAAG
          460     470     480     490     500
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] GCAAATCTGCTATTCTGTTAAGATCCTTAGCGCCATCCCTCTCGAAGG
          510     520     530
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          540     550
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] TCTTGTTTTATGCTGTGTTTC---AAACACGTGAGAGTTATCATCTAT
          560     570
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] TTTTGTTTGTCGTGCTGTCTATTGAAACACGTGAGAGGGTTCATCTAT
          580     590
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          600     610
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] GTAATTTTACAGGCAATAAATAACATCTTAC
          620     630
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] GTATTTATAGGTAATAAATAACATCTT--
          640     650
LvCрус Ia [FE175664] .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LvCрус Ib [FE099583] ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

As sequências nucleotídicas das crustinas *LvCрус Ia* e *LvCрус Ib* foram alinhadas com o algoritmo ClustalW para identificação de regiões específicas para a escolha dos iniciadores. A régua acima das sequências indica a posição dos nucleotídeos. As sequências dos iniciadores específicos para *LvCрус Ia* e *LvCрус Ib* estão destacadas em preto e cinza, respectivamente. Os asteriscos (*) representam nucleotídeos idênticos.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica.

Gene	Referência (N° GenBank)	Sequência dos iniciadores (5' - 3')	Produto de amplificação	Eficiência (%)
β -actina	CADORET <i>et al.</i> , 1999	S: TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG AS: TCACCAACTGGGATGACATGG	846 pb	*
<i>LvEF1α</i>	DE LA VEGA <i>et al.</i> , 2008 [GU136229]	S: TGGCTGTGAACAAGATGGACA AS: TTGTAGCCACCTTCTTGACG	103 pb	97,2%
<i>LvRpL40</i>	[KJ831563]	S: GAGAATGTGAAGGCCAAGATC AS: TCAGAGAGAGTGCGACCATC	104 pb	95,3%
<i>LvRpS6</i>	GONCALVES <i>et al.</i> , 2014 [FE080516]	S: AGCAGATACCCCTTGGTGAAG AS: GATGCAACCACGGACTGAC	193 pb	98,8%
<i>LvRpS3A</i>	DE LA VEGA <i>et al.</i> , 2008 [BF023924]	S: GGCTTGCTATGGTGTGCTCC AS: TCATGCTCTTGGCTCGCTG	101 pb	97,4%
<i>LvCrus Ia</i> (Tipo I)	[FE175664]	S: CGTTGAAGATCACAGTGGAG AS: TTGCGGAATGGAATCCTC	180 pb	84,5%
<i>LvCrus Ib</i> (Tipo I)	[FE099583]	S: CTGTAAAGATCCTTGAGCCG AS: TCAATAGACAGCACAGAC	111 pb	76,7%
<i>LvCrustin</i> (Tipo IIa)	[AY488496]	S: CGAACCAGAGACACCTGTTG AS: CAGCACACTTGTAGTCGTTG	113 pb	78,4%
Crustin-like (Tipo IIb)	[JQ824114]	S: GCAGGATAAAGACAAGGC AS: GTAATTGCAGTTGAATCCGCC	199 pb	87,7%
<i>LvSWD</i> (Tipo III)	[AY465833]	S: GTCATCACGGAGAGGAACTG AS: CTTCCGTTTCCGTAAGGAGG	116 pb	96,0%
<i>LvSPLI</i> (Tipo IV)	[EF467169]	S: TGCATCCACTACCACCACTC AS: TCTGCGCTTAGCCTTCCTTG	109 pb	95,8%

LvEF1 α : Fator de alongação 1 α ; *LvRpL40*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*: proteínas ribossomais L40, S6 e S3A, respectivamente; *LvCrus Ia*: Crustina Tipo Ia; *LvCrus Ib*: Crustina Tipo Ib; *LvCrustin*: Crustina Tipo IIa; *LvCrustin-like*: Crustina Tipo IIb; *LvSWD*: Crustina Tipo III; *LvSPLI*: Crustina Tipo IV. *O gene β -actina foi utilizado somente nas análises semi-quantitativas de expressão gênica (sem valores de eficiência). S: iniciador senso. AS: iniciador antissenso.

4.7. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

As reações de transcrição reversa seguida PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas utilizando o sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®). As reações foram executadas em um volume final de 15 µL (em duplicatas) na presença de 1 µL de cDNA (diluído 10 vezes), 0,2 µM de cada iniciador (**Tabela 1**) e 7,5 µL Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2× (Thermo Scientific®). Para a amplificação, foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e hibridização/extensão a 60°C por 1 min. A especificidade das reações foi confirmada pela análise de curvas de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s), realizada após as etapas de amplificação. Para a determinação da eficiência dos iniciadores, foi avaliada a amplificação das sequências de interesse utilizando-se diluições seriadas (curva padrão: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) de um *pool* de todos os cDNAs das amostras de hemócitos das infecções virais e bacterianas. Os valores de C_q (ciclo de quantificação) de cada diluição foram utilizados para a construção de uma curva linear, cujo valor de *slope* (coeficiente angular da reta) foi utilizado para o cálculo da eficiência (E) dos pares de iniciadores segundo a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

O programa RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/>) foi utilizado para a escolha da melhor condição referência entre quatro genes candidatos: *LvEF1α* (GenBank: GU136229), *LvRpL40* (GenBank: KJ831563), *LvRpS6* (GenBank: FE080516) e *LvRpS3A* (GenBank: BF023924). Nesse programa, a escolha está baseada no cálculo do coeficiente de estabilidade dos genes candidatos utilizando algoritmos de quatro outros programas (geNorm, Normfinder, BestKeeper e Comparative ΔCT), que leva em consideração a variação dos valores de C_q entre as diferentes amostras. Assim, quanto menor o valor do coeficiente, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais. Para uma análise mais apurada, foi considerada ainda a média geométrica dos valores de C_q das diferentes combinações dos genes candidatos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Para os iniciadores que apresentaram uma eficiência de amplificação entre 95% e 105%, os valores de expressão relativa foram calculados com base nos valores de C_q dos genes de interesse em relação aos valores de C_q da referência ($\Delta C_q = C_q$ do gene alvo

subtraído do Cq da referência). Os níveis de expressão foram então calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando o grupo *naïve* (animais não manipulados) como condição calibradora. Os níveis de expressão relativa dos genes cujos iniciadores apresentaram uma eficiência inferior a 95% foram calculados segundo o método da Curva Padrão Comparativa, utilizando-se como referência o gene *LvRpL40* GenBank: KJ831563). Para isso, foram utilizadas diluições seriadas (curva padrão: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) de um *pool* de todos os cDNAs das amostras de hemócitos das infecções virais e bacterianas. O grupo *naïve* foi escolhido como condição calibradora.

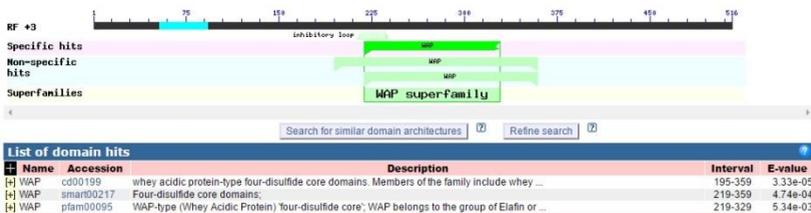
Os dados de RT-qPCR foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey. As análises estatísticas e a construção dos gráficos de expressão foram realizadas no programa GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, Inc.). As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas quando as variações de expressão gênica mostraram-se superiores a 1,5 vezes e o $P < 0,05$. As análises e a nomenclatura utilizadas neste trabalho foram baseadas nas recomendações do MIQE guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009).

5. RESULTADOS

5.1. IDENTIFICAÇÃO DE CRUSTINAS DO TIPO I EM *L. vannamei*

A identificação de sequências codificantes para crustinas do Tipo I foi realizada por meio de buscas em bancos de dados públicos de EST não anotados do camarão *L. vannamei* pela ferramenta tBLASTx do NCBI. Para isso, foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) 41 sequências (nucleotídicas ou aminoacídicas) de 22 espécies de crustáceos. Apenas sequências de crustinas do Tipo I (*Carcinina-like*) foram utilizadas como *query*. Essas sequências foram escolhidas segundo os critérios de classificação de crustinas proposto por (SMITH *et al.*, 2008): (1) presença de 12 resíduos conservados de cisteína (8 deles formando um domínio WAP conservado na região C-terminal) e (2) ausência de um domínio rico em resíduos de glicina na região N-terminal. Nessa busca, 12 ESTs com a região codificadora (CDS ou *Coding Sequence*) completa foram encontradas em 2 diferentes bancos transcriptômicos de *L. vannamei*: **Cordão nervoso** (10 sequências; GenBank: FE181717, FE175664, FE190750, FE174053, FE175665, FE181718, FE190749, FE177817, FE174052, FE177818) e **Hemócitos** (2 sequências; GenBank: FE099582, FE099583) (**Figura 7A**).

As sequências aminoacídicas das crustinas resgatadas foram deduzidas a partir da CDS das sequências nucleotídicas e analisadas para a identificação de domínios proteicos conservados. Assim como observado em outras crustinas, o peptídeo maduro das crustinas identificadas em *L. vannamei* apresentou os 12 resíduos de cisteína característicos dessa família, os quais incluem um único domínio WAP na região C-terminal (**Figura 7B**). Nenhum domínio rico em resíduos de glicina foi identificado na região N-terminal das sequências obtidas. De maneira interessante, enquanto que as 10 crustinas identificadas nos bancos transcriptômicos de cordão nervoso apresentaram uma CDS de 318 pb (precursor de 105 resíduos de aminoácidos), as 2 crustinas dos bancos de hemócitos apresentaram uma CDS de 363 pb (precursor de 120 resíduos de aminoácidos). Além de menores, as crustinas dos bancos de cordão nervoso apresentaram outras importantes diferenças aminoacídicas com as crustinas dos bancos hemocitários, sugerindo assim a existência de, pelo menos, 2 subgrupos de crustinas do Tipo I em *L. vannamei* (**Figura 7A**). Com base nessas análises, as crustinas identificadas nos bancos de cordão nervoso foram denominadas de



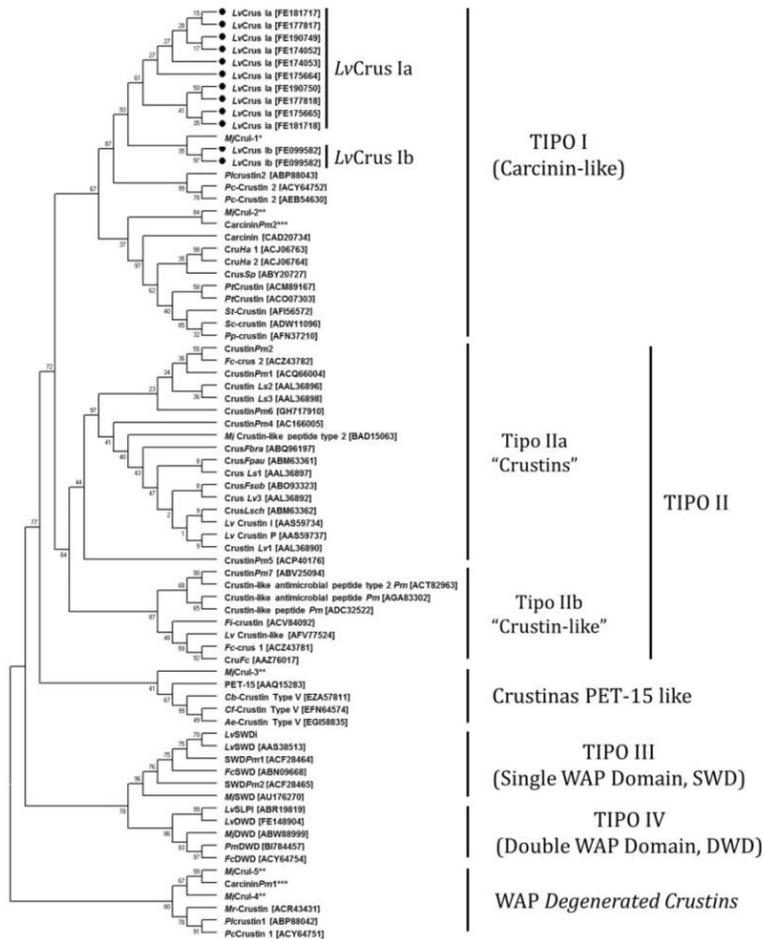
A. As sequências aminoacídicas deduzidas das crustinas resgatadas foram alinhadas e os resíduos conservados estão destacados em preto. A régua acima das sequências indica as posições dos resíduos de aminoácidos enquanto que a linha vermelha indica o domínio WAP. Resíduos específicos das sequências de *LvCrus Ia* estão destacados na cor amarela e os de *LvCrus Ib* estão destacados na cor azul. O símbolo ▼ indica os 12 resíduos conservados de cisteína. B. Resultado do programa Conserved Domain Database ilustrando a presença de um domínio WAP nas sequências resgatadas.

As sequências identificadas em *L. vannamei* como crustinas do Tipo I foram então analisadas e comparadas com diferentes Tipos de crustinas (Tipos I a V) de 24 espécies de crustáceos e insetos através de uma reconstrução filogenética (método estatístico Neighbor Joining). De acordo com a análise do cladograma resultante do alinhamento aminoacídico da região residente entre o primeiro e o último resíduo de cisteína, as 12 sequências resgatadas agruparam-se no mesmo grande clado da Carcinina do caranguejo *C. maenas* (GenBank: CAD20734) e de outras crustinas do Tipo I (ou Carcinina-like) encontradas em outras espécies de crustáceos decápodes (**Figura 8**). Este clado, composto em maior parte por crustinas de caranguejos, lagostas e lagostins (Subordem Pleocyemata), reuniu três sequências de outras duas espécies de camarões peneídeos (Subordem Dendrobranchiata), a saber: *MjCruI-1* e *MjCruI-2* do camarão *M. japonicus* e *CarcininPm2* do camarão *P. monodon*. O clado das crustinas do Tipo I formou um grupo irmão com as crustinas do Tipo II (Tipos IIa e IIb) e separado dos demais Tipos de crustinas. O clado mais próximo das crustinas dos Tipos I e II agrupou as sequências semelhantes à sequência PET-15 da lagosta *Panulirus argus* (GenBank: AAQ15293), que incluem a *MjCruI-3* do camarão *M. japonicus* e as crustinas descritas em insetos, classificadas por TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP (2015) como crustinas do Tipo V. As crustinas dos Tipos III (SWD) e IV (DWD) foram agrupadas em um clado comum. Um grupo de crustinas apresentou a região WAP degenerada (designadas neste trabalho como “WAP degenerated Crustins”) e formaram um clado distinto de todos os

outros grupos. Esse último grupo inclui sequências que foram anteriormente classificadas como “crustinas do Tipo I ou Carcinina-like” nos camarões peneídeos *M. japonicus* (*MjCruI-4* e *MjCruI-5*) e *P. monodon* (*CarcininPm1*), no camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (*Mr-Crustin*; GenBank: ACR43431) e nos lagostins *P. leniusculus* (*Plcrustin1*; GenBank ABP88042) e *P. clarkii* (*Pccrustin1*; GenBank: ACY64751).

Dentro do clado das autênticas crustinas do Tipo I, as 10 sequências de *LvCruIa* formaram um grupo distinto das 2 sequências de *LvCruIb*, que se agruparam num mesmo clado com a *MjCruI-1* do camarão *M. japonicus* (**Figura 8**). Esses dois grupos de crustinas formaram um grupo irmão com as sequências *Plcrustin2* (GenBank: ABP88043) de *P. leniusculus* e *PcCru* (= *Pccrustin2*; GenBank: ACY64752) de *P. clarkii*. Esse grupo mostrou-se diferente de crustinas autênticas do Tipo I de camarões peneídeos (*CarcininPm2* de *P. monodon* e *MjCruI-2* de *M. japonicus*), que se agruparam com as crustinas de caranguejos e lagostas (**Figura 8**).

Figura 8. Cladograma resultante do alinhamento da região compreendida entre os 12 resíduos conservados de cisteína dos diferentes Tipos de crustinas (Tipos I a V).



As regiões comuns às seqüências aminoacídicas das crustinas de *L. vannamei* e de outras 12 espécies de crustáceos decápodes foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW previamente à elaboração do cladograma. O cladograma foi construído utilizando o método de Neighbor Joining (1.000 replicatas) no programa MEGA 6.0. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós da árvore. ●: seqüências de crustinas de *L. vannamei* resgatadas. O número de acesso no GenBank das seqüências está entre colchetes. *LIU *et al.*, 2015b. **JIANG *et al.*, 2015. ***DONPUDSA *et al.*, 2014.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS CRUSTINAS DO TIPO I DE *L. vannamei*

Os 2 subgrupos de crustinas identificados em *L. vannamei* apresentaram uma assinatura aminoacídica específica, mas condizente com a assinatura comum a todas as crustinas do Tipo I (**Figura 9A**). Essa assinatura é caracterizada pela ausência de um domínio N-terminal rico em resíduos de glicina (característico das crustinas do Tipo II) e pela presença de 12 resíduos de cisteína arranjados em posições definidas, sendo os 8 localizados na região C-terminal compõem o domínio WAP. Outros resíduos aminoacídicos conservados e situados em posições específicas acompanham as 12 cisteínas e também compõem tal assinatura, tais como tirosina (Y), glicina (G), prolina (P) e histidina (H). Analogamente, a assinatura molecular própria das crustinas do Tipo I obedece ao padrão observado para todas as crustinas, representando uma extensão da assinatura molecular que caracteriza essa família de AMPs (**Figura 9B**).

Figura 9. Assinatura aminoacídica das crustinas do Tipo I de crustáceos decápodes.

A

Crustinas	C X ₂₋₃	C X _n	CC X _n	CP X ₄₋₅	C X _n	CXXDXX CX ₄₋₅	KCCXD X ₅₋₇	C
Tipo I	C X ₃	C X ₇₋₁₁	YCC X ₁₃₋₁₅	GXC PX ₅	C X ₅₋₇	PX₂CPXDGX CX ₄	KCCXD X ₃	HXC
LvCrus I	C X ₂	Y CX ₁₂	YCC X ₁₅	GXC PX ₅	C X ₆	PX₂CPXDXX CX ₄	KCCXD X ₃	HXC

A. Assinatura aminoacídica das crustinas, crustinas do Tipo I e das crustinas do Tipo I do camarão *L. vannamei*. Os resíduos conservados em todas as sequências estão destacados em preto e os comuns apenas às crustinas do Tipo I ou às crustinas do Tipo I de *L. vannamei* estão destacados em cinza. A letra X indica qualquer resíduo aminoacídico em um intervalo de n resíduos. A linha vermelha indica o domínio WAP. **B.** As sequências aminoacídicas das regiões comuns às crustinas do Tipo I foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW. Os resíduos conservados em todas as crustinas do Tipo I estão destacados em preto. A régua acima das sequências indica as posições dos resíduos de aminoácidos enquanto que a linha vermelha indica o domínio WAP. O símbolo ▼ indica os 12 resíduos conservados de cisteína. Hífens indicam *gaps*. *LIU *et al.*, 2015b. **JIANG *et al.*, 2015. ***DONPUDSA *et al.*, 2014.

As sequências aminoacídicas precursoras do grupo *LvCrus Ia* (identificadas em bancos de cordão nervoso) apresentaram um peptídeo sinal contendo 21-22 resíduos de aminoácidos seguido de um peptídeo maduro aniônico (pI : 5,01-5,64) com uma massa molecular média de 9,6 kDa (84 resíduos de aminoácidos) (**Tabela 2**). Das 10 *LvCrus Ia*, 6 sequências (GenBank: FE190749, FE174052, FE175664, FE190750, FE174053, FE175665) apresentaram 2 resíduos de metionina (M) seguidos no início da CDS (**Figura 10**). As sequências de *LvCrus Ia* apresentaram 84% e 70% de identidade aminoacídica com *LvCrus Ib* e *MjCruI-1*, respectivamente, e ~41% com as demais crustinas do Tipo I (incluindo a Carcinina). Essas sequências apresentaram ~34% de identidade aminoacídica com crustinas do Tipo II (IIa e IIb) de *L. vannamei* e menos de 30% de identidade com *LvSWD* e *LvSPLI*, crustinas dos Tipos III e IV de *L. vannamei*, respectivamente.

Uma interessante diversidade intraespecífica foi observada no grupo *LvCrus Ia*. Doze polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs ou *Single Nucleotide Polymorphisms*) foram identificados entre as CDS das sequências pertencentes a este grupo, 7 dos quais resultaram em substituições no resíduo aminoacídico presente no peptídeo maduro, principalmente dentro do domínio WAP. As variações ocorreram nos resíduos situados nas posições 48, 58, 81, 88, 95, 99 e 104 (**Figura 10**) e envolveram, em todos os casos, a permutação de apenas um resíduo.

	110	120	130	140	150	
LvCrus Ia [FE190749]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				
LvCrus Ia [FE174052]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				50
LvCrus Ia [FE175664]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				50
LvCrus Ia [FE190750]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				50
LvCrus Ia [FE174053]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				50
LvCrus Ia [FE175665]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				50
LvCrus Ia [FE181718]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				50
LvCrus Ia [FE181717]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				49
LvCrus Ia [FE177817]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				49
LvCrus Ia [FE177818]	CGGAAGGAGAGGAGAGGCCCGTGTACTGCTGCCGACGACGGGA	CGGTCCGGC				49
	160	170	180	190	200	
LvCrus Ia [FE190749]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					67
LvCrus Ia [FE174052]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					67
LvCrus Ia [FE175664]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					67
LvCrus Ia [FE190750]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					67
LvCrus Ia [FE174053]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					67
LvCrus Ia [FE175665]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					67
LvCrus Ia [FE181718]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					66
LvCrus Ia [FE181717]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					66
LvCrus Ia [FE177817]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					66
LvCrus Ia [FE177818]	GACCCGCCTCCCCTTGAAGATCCAGTGGAGAATGCCCCGACGTTCCGGCG					66
	210	220	230	240	250	
LvCrus Ia [FE190749]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			83
LvCrus Ia [FE174052]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			83
LvCrus Ia [FE175664]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			83
LvCrus Ia [FE190750]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			83
LvCrus Ia [FE174053]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			83
LvCrus Ia [FE175665]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			83
LvCrus Ia [FE181718]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			82
LvCrus Ia [FE181717]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			82
LvCrus Ia [FE177817]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			82
LvCrus Ia [FE177818]	TCACTGCCTTCGCTTCAAAGGGCCA	CCAAATGTGTGCCCCCA	CGACGGTT			82

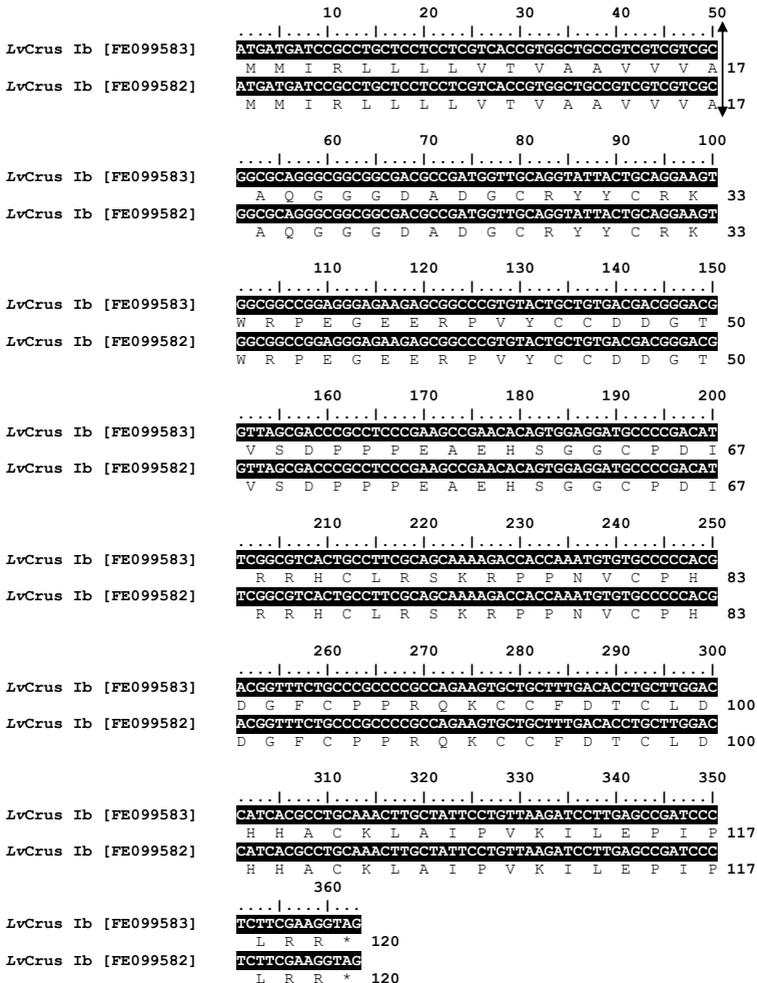
	260	270	280	290	300	
LvCrus Ia [FE190749]	TCTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S N	Q K C C W D	T C L D H H			100
LvCrus Ia [FE174052]	TCTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S N	Q K C C W D	T C L D H H			100
LvCrus Ia [FE175664]	TCTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S S	Q K C C W D	T C L D H H			100
LvCrus Ia [FE190750]	TCTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S N	Q K C C W D	T C L D H H			100
LvCrus Ia [FE174053]	TCTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S N	Q K C C W D	P C L D H H			100
LvCrus Ia [FE175665]	TCTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S S	Q K C C W D	P C L D H H			100
LvCrus Ia [FE181718]	TTTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S N	Q K C C W D	P C L D P H			99
LvCrus Ia [FE181717]	TCTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S N	Q K C C W D	T C L D H H			99
LvCrus Ia [FE177817]	TCTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S N	Q K C C W D	T C L D H H			99
LvCrus Ia [FE177818]	TCTGCCCGTCCA	CCAAAAGT GCTGCTGGGAC	CCTGCTGGACCA	TCAT		
	F C P S N	Q K C C W D	T C L D H H			99
		310	320			
					
LvCrus Ia [FE190749]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				106
LvCrus Ia [FE174052]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				106
LvCrus Ia [FE175664]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				106
LvCrus Ia [FE190750]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				106
LvCrus Ia [FE174053]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				106
LvCrus Ia [FE175665]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				106
LvCrus Ia [FE181718]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				105
LvCrus Ia [FE181717]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				105
LvCrus Ia [FE177817]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				105
LvCrus Ia [FE177818]	GCTTGTA AAC	CCCTGTTAA				
	A C K L	P V *				105

As dez seqüências do grupo LvCrus Ia foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW. Nas linhas destacadas em preto estão as seqüências nucleotídicas e na linha abaixo destas encontram-se as seqüências aminoacídicas deduzidas correspondentes. O provável sítio de clivagem do peptídeo sinal está indicado por uma seta com duas cabeças. A régua acima das seqüências indica as posições nucleotídicas e os números à direita das seqüências indicam a posição do último resíduo de aminoácido dessa linha. Os nucleotídeos conservados estão destacados em preto, enquanto que os sítios polimórficos nas seqüências nucleotídicas e aminoacídicas estão destacados em amarelo. Os asteriscos (*) indicam códons de parada.

Diferente de LvCrus Ia, as duas seqüências de crustinas do grupo LvCrus Ib (identificadas em bancos transcriptômicos de hemócitos) foram idênticas. Elas mostraram 45,2% de identidade aminoacídica com

a Carcinina e apresentaram uma CDS um pouco mais extensa, contendo 363 pb traduzida em um peptídeo sinal contendo 17 resíduos de aminoácidos, seguido de um peptídeo maduro catiônico (pI : 7,66) de 11,55 kDa (103 resíduos de aminoácidos) (**Tabela 2**). A duplicação no resíduo de metionina inicial foi igualmente observada nessas duas sequências (**Figura 11**). As duas sequências pertencentes a este grupo mostraram 70,5% de identidade aminoacídica com *MjCruI-1* e ~45% com as demais crustinas do Tipo I. Essas sequências apresentaram ~33% de identidade aminoacídica com crustinas do Tipo II (IIa e IIb) de *L. vannamei* e menos de 30% de identidade com *LvSWD* (Tipo III) e *LvSPLI* (Tipo IV).

Figura 11. Alinhamento das sequências nucleotídicas e aminoácídicas das 2 sequências de *LvCrus Ib* identificadas.



As duas sequências do grupo *LvCrus Ib* foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW. Nas linhas destacadas em preto estão as sequências nucleotídicas e na linha abaixo destas encontram-se as sequências aminoácídicas deduzidas correspondentes. O provável sítio de clivagem do peptídeo sinal está indicado por uma seta com duas cabeças. A régua acima das sequências indica as posições nucleotídicas e os números à direita das sequências indicam a posição do último resíduo de aminoácido dessa linha. Os asteriscos (*) indicam códons de parada.

5.3. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA

A distribuição da expressão gênica de crustinas foi avaliada de forma semi-quantitativa (RT-TDPCR) em oito tecidos/órgãos (músculo, brânquias, cordão nervoso, estômago, hepatopâncreas, intestino médio, intestino posterior e hemócitos) de animais estimulados ou não com a bactéria *V. harveyi* ATCC 14126 (inativadas por calor). Inicialmente, o perfil de migração do RNA total das diferentes amostras foi avaliado em gel de agarose. Foi possível visualizar a presença de bandas correspondentes aos diferentes tipos de RNA ribossomal (provavelmente os tipos 28S, 18S e 5S). Apesar de as amostras terem apresentado padrões distintos de migração e abundância dos diferentes tipos de RNA ribossomal (como exemplificado pelas amostras de hepatopâncreas), nenhum sinal evidente de degradação foi identificado (**Figura 12**). Além disso, a amplificação de transcritos de β -actina mostrou-se estável em todas as amostras, validando assim as comparações de expressão das crustinas entre os grupos experimentais (**Figura 13**).

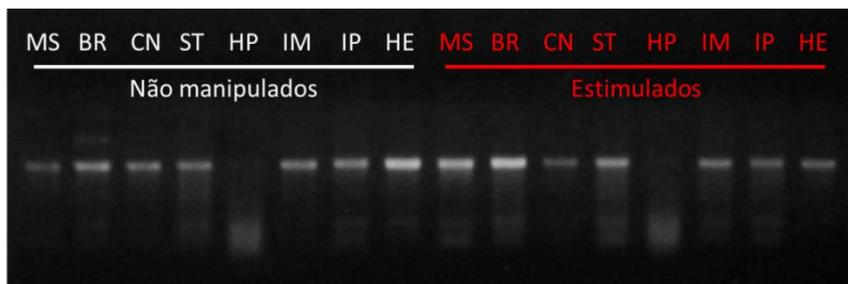
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos de crustinas de diferentes espécies de crustáceos decápodes.

Espécie	Anotação	GenBank	Peptídeo Sinal	Peptídeo maduro			
			aa	aa	MM	pI	
CRUSTINAS DO TIPO I							
<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI81718	21	84	9,49	5,01	
	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI81717	21	84	9,66	5,64	
	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI77817	21	84	9,66	5,64	
	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI77818	21	84	9,62	5,44	
	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI90749	22	84	9,66	5,64	
	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI74052	22	84	9,66	5,64	
	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI75664	22	84	9,63	5,64	
	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI90750	22	84	9,62	5,44	
	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI74053	22	84	9,62	5,44	
	<i>Lv</i> Crus Ia	FEI75665	22	84	9,55	5,22	
	<i>Lv</i> Crus Ib	FE099583	17	103	11,55	7,66	
	<i>Lv</i> Crus Ib	FE099582	17	103	11,55	7,66	
	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	<i>Mj</i> CruI-1	*	17	93	10,76	7,67
		<i>Mj</i> CruI-2	**	16	108	11,91	6,19
<i>Penaeus monodon</i>	<i>CarcininPm</i> 2	***	16	111	12,28	7,63	
<i>Carcinus maenas</i>	<i>Carcinin</i>	CAD20734	21	89	10,24	8,74	
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Pc</i> crustin2	ABP88043	16	93	10,61	8,28	
<i>Procambarus clarkii</i>	<i>Pc</i> -Crustin 2	AEB54630	16	94	10,64	8,29	
	<i>Pc</i> -Crustin 2	ACY64752	16	94	10,62	8,48	
<i>Portunus pelagicus</i>	<i>Pp</i> -crustin	AFN37210	21	90	10,25	8,76	
<i>Scylla paramamosain</i>	<i>CrusSp</i>	ABY20727	21	90	10,28	8,98	
<i>Hyas araneus</i>	<i>CruHa</i> 1	ACJ06763	23	90	10,08	8,46	
<i>Portunus trituberculatus</i>	<i>Pt</i> Crustin	ACM89167	21	89	10,08	8,25	
	<i>Pt</i> Crustin	ACO07303	21	89	10,13	8,49	
<i>Scylla tranquebarica</i>	<i>St</i> -Crustin	AFI56572	21	90	10,08	8,27	
<i>Scylla serrata</i>	<i>Sc</i> -crustin	ADW11096	21	90	10,24	8,76	
CRUSTINAS DO TIPO II							
<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>CrustinLv</i> 1	AF430071	18	146	14,28	7,61	
	<i>Lv</i> Crustin-like	FE049920	17	131	12,66	8,02	
<i>Penaeus monodon</i>	<i>CrustinPm</i> 6	GH717910	18	144	14,82	7,59	
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	<i>Fc</i> -crus 1	DQ097703	17	118	11,90	7,59	
<i>Litopenaeus setiferus</i>	<i>CrustinLs</i> 1	AF430078	18	171	16,10	7,62	
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	<i>CrusFbra</i>	EF601055	18	157	15,32	8,29	
CRUSTINAS DO TIPO III							
<i>Litopenaeus vannamei</i>	SWD-Containing protein	AY464465	24	68	7,30	8,52	
<i>Penaeus monodon</i>	SWDPm 1	EU623979	24	68	7,29	8,52	
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	<i>Fc</i> SWD	EF216349	24	66	6,98	8,52	
<i>Procambarus clarkii</i>	<i>Pc</i> SWD	ACY64753	20	54	5,96	7,71	
CRUSTINAS DO TIPO IV							
<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>Lv</i> SLP1	EF467169	16	100	10,93	7,93	
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	<i>Mj</i> DWD	EU095018	16	111	11,14	7,92	
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	<i>Fc</i> DWD	GQ303571	16	111	11,10	8,34	
<i>Eriocheir sinensis</i>	<i>Es</i> DWD	ADF87939	22	111	12,05	7,57	

aa: número de resíduos de aminoácidos; MM: massa molecular em kDa; pI: ponto isoelétrico teórico.

*LIU *et al.*, 2015b. **JIANG *et al.*, 2015. ***DONPUDSA *et al.*, 2014.

Figura 12. Perfil de migração do RNA total das amostras (*pools* de 3 camarões) dos oito tecidos/órgãos das duas condições experimentais (não manipulados e estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126).

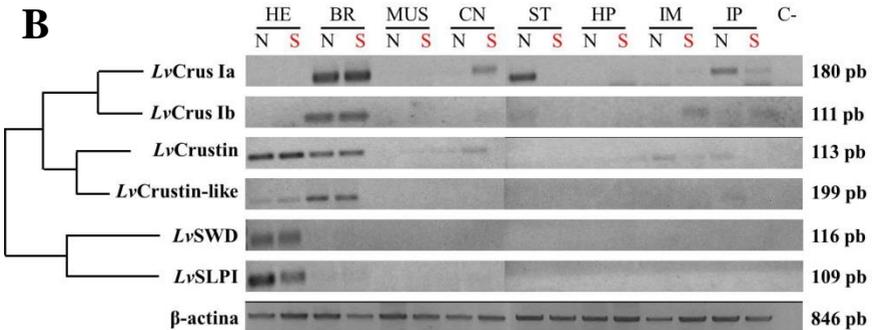
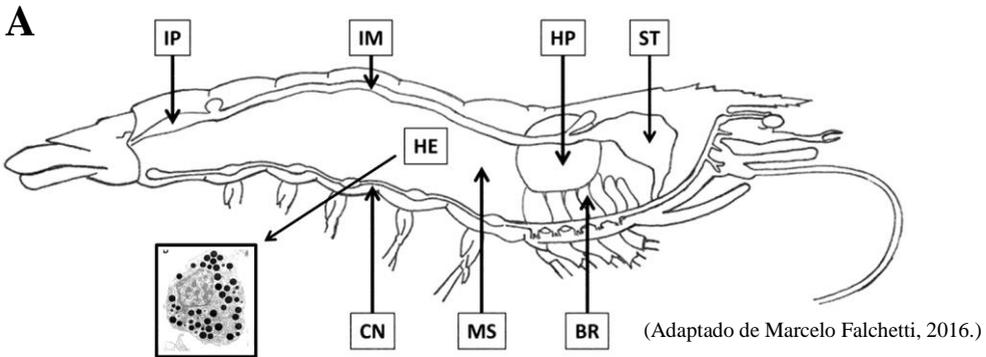


MS: Músculo, BR: Brânquias, CN: Cordão nervoso, ST: Estômago, HP: Hepatopâncreas, IM: Intestino médio, IP: Intestino posterior, HE: Hemócitos.

Para as análises de expressão, foram escolhidos iniciadores específicos para as crustinas *LvCrus Ia* e *LvCrus Ib* (**Figura 6**). A fim de comparar o perfil transcricional de crustinas do Tipo I com outros Tipos de crustinas presentes em *L. vannamei*, as análises de distribuição da expressão gênica foram também realizadas para os Tipos II (IIa e IIb), III (*LvSWD*) e IV (*LvSLPI*). A distribuição da expressão das crustinas do Tipo I foi similar. Interessantemente, a expressão desse grupo de crustinas foi marcante nas brânquias, tanto de animais estimulados quanto de não manipulados, contrastando com o observado para os demais grupos (**Figura 13**). Transcritos foram detectados no cordão nervoso e intestino médio de animais após o estímulo bacteriano, em contraste com o observado no estômago onde foi possível detectar a presença de transcritos unicamente em animais não manipulados (**Figura 13**). Ainda, pôde-se detectar a presença de transcritos desse grupo no intestino posterior de animais de ambos os tratamentos, embora em quantidades consideravelmente menores no grupo de animais desafiados. Não foi possível detectar a presença desses transcritos em hemócitos de animais de ambos os grupos experimentais (**Figura 13**). Transcritos de crustinas do Tipo II (*LvCrustin* e *LvCrustin-like*) foram detectados principalmente em hemócitos e brânquias de animais estimulados e não manipulados. No entanto, pôde-se detectar, ainda que em aparente baixa abundância, a presença desses transcritos no cordão nervoso e intestinos de animais de ambos os tratamentos

(Figura 13). Transcritos de *LvSWD* (Tipo III) e *LvSLPI* (Tipo IV) foram detectados unicamente em hemócitos de animais estimulados e não manipulados (Figura 13).

Figura 13. Análise semi-quantitativa da distribuição da expressão de crustinas em oito tecidos/órgãos de camarões após 48 h de um estímulo microbiano em comparação a animais não estimulados.



A. Esquema ilustrativo de um camarão mostrando a posição anatômica dos órgãos/tecidos estudados.

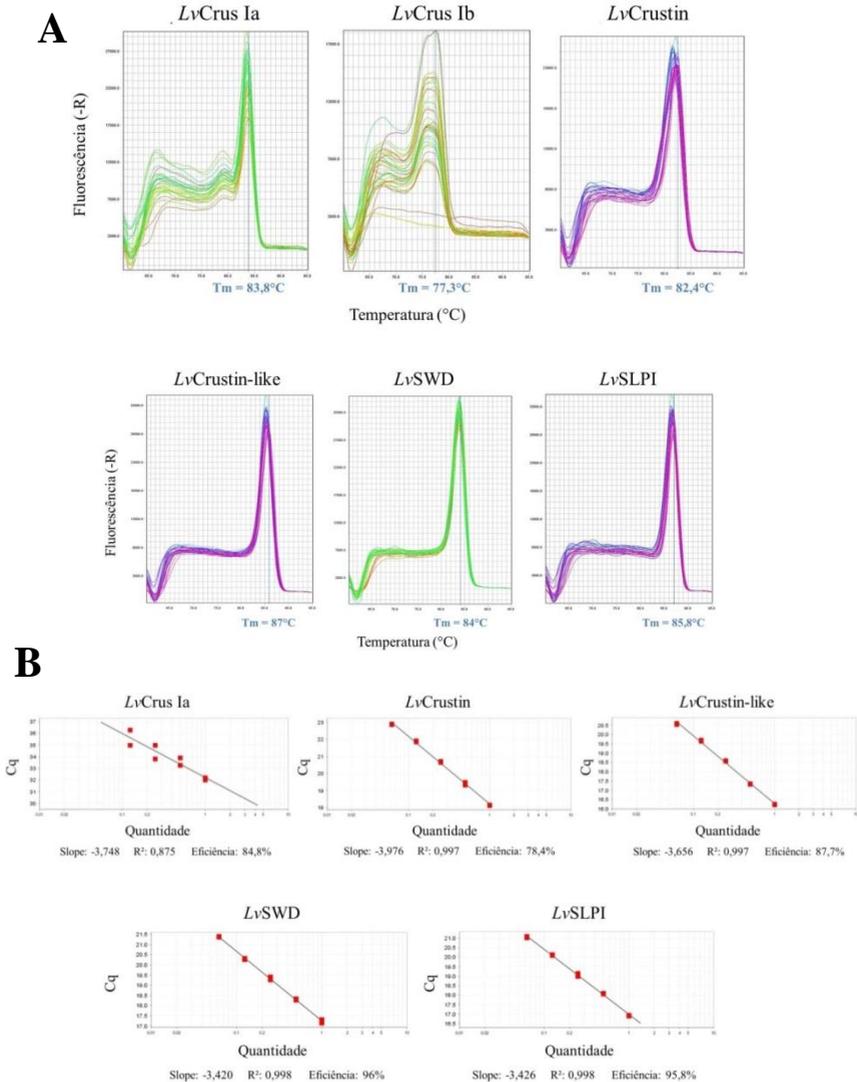
B. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo mostrando a amplificação dos transcritos das crustinas *LvCrus Ia*, *LvCrus Ib*, *LvCrustin* (Tipo IIa), *LvCrustin-like* (Tipo IIb), *LvSWD* (Tipo III), *LvSLPI* (Tipo IV) e da β -actina (controle). As linhas à esquerda representam, esquematicamente, a relação filogenética entre as sequências. ST: Estômago, HP: Hepatopâncreas, IM: Intestino médio, IP: Intestino posterior, HE: Hemócitos, MUS: Músculo, BR: Brânquias, CN: Cordão nervoso, C-: Controle

negativo. N: grupo *naïve* (animais não manipulados); S: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (inativada por calor).

5.4. PERFIL TRANSCRICIONAL DE CRUSTINAS FRENTE A INFECÇÕES VIRAIS E BACTERIANAS

Os níveis de expressão gênica das crustinas de *L. vannamei* foram avaliados 48 h após infecções experimentais com o WSSV ou com a bactéria *V. harveyi* ATCC 14126. Primeiramente, foi avaliada a especificidade e a eficiência dos iniciadores específicos para os diferentes Tipos de crustina de *L. vannamei*. As análises de curva de dissociação mostraram que os pares de iniciadores para *LvCrus Ia*, *LvCrustin* (Tipo IIa), *LvCrustin-like* (Tipo IIb), *LvSWD* (Tipo III) e *LvSLPI* (Tipo IV) geraram um único pico (**Figura 14A**), indicando a amplificação de uma única sequência e confirmando a especificidade dos pares de iniciadores. Os iniciadores para *LvCrus Ib* geraram picos de dissociação inespecíficos, indicando a amplificação de mais de uma sequência com temperaturas de dissociação similares (**Figura 14A**). Por esta razão, a expressão de *LvCrus Ib* não foi avaliada por RT-qPCR. Os iniciadores utilizados para a amplificação de *LvCrus Ia*, *LvCrustin*, *LvCrustin-like*, *LvSWD* e *LvSLPI* apresentaram eficiência de 84,8%, 78,4%, 87,7%, 96% e 95,8%, respectivamente (**Figura 14B**).

Figura 14. Curvas de dissociação e eficiência dos iniciadores utilizados para a amplificação das crustinas de *Litopenaeus vannamei*.

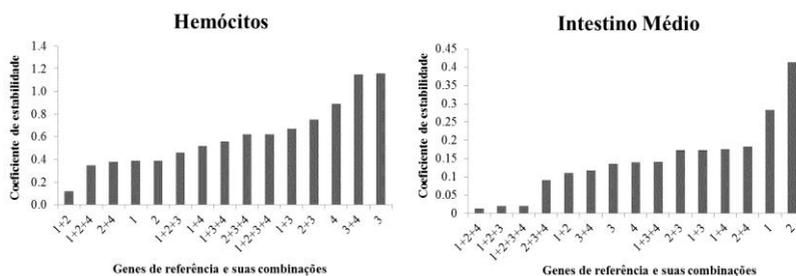


A. Perfil derivado da curva de dissociação dos produtos de RT-qPCR dos iniciadores utilizados para a amplificação dos transcritos das crustinas *LvCrus Ia*, *LvCrustin*, *LvCrustin-like*, *LvSWD* e *LvSLPI*. T_m: Temperatura de desnaturação (*melting*). **B.** Curva linear resultante da amplificação dos

transcritos de *LvCrus Ia*, *LvCrustin*, *LvCrustin-like*, *LvSWD* e *LvSLPI* utilizando-se diluições seriadas (curva padrão: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) de um *pool* de todos os cDNAs de amostras de hemócitos das infecções virais e bacterianas. A eficiência (%) dos pares de iniciadores foi calculada segundo a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

Em seguida, foi realizada a escolha da melhor referência para os cálculos de expressão relativa. Para normalizar a expressão dos genes calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$, a expressão de quatro genes candidatos foi avaliada: a do Fator de alongação 1α (*LvEF1 α*) e de três proteínas ribossomais (*LvRpL40*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*). A análise para a escolha da melhor referência levou em consideração o coeficiente de estabilidade dos valores de Cq, calculado pelo programa RefFinder. A condição que apresentou a menor variação de expressão em hemócitos foi média geométrica dos genes *LvEF1 α* e *LvRpL40* e, no intestino médio, a média geométrica dos genes *LvEF1 α* , *LvRpL40* e *LvRpS3A*, obtidas pelos programas BestKeeper e NormFinder, respectivamente (dois dos quatro programas utilizados pelo RefFinder) (**Figura 15**). A normalização da expressão dos genes calculados com a curva padrão comparativa (*LvCrustin* e *LvCrustin-like*) foi realizada com o gene *LvRpL40* que, juntamente com o gene *LvEF1 α* , apresentou a menor variação de expressão nos diferentes tratamentos.

Figura 15. Coeficiente de estabilidade dos candidatos à referência.

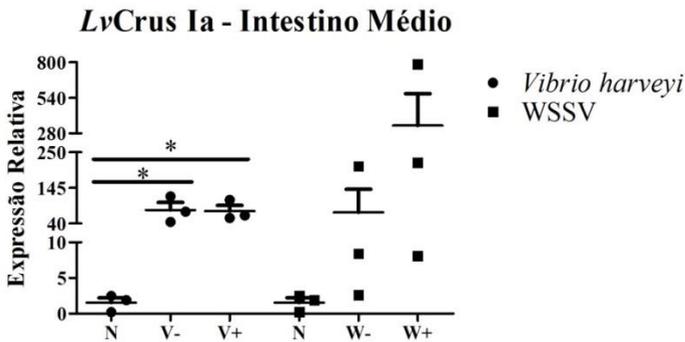


Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes e da média geométrica de suas diferentes combinações. 1: *LvEF1 α* ; 2: *LvRpL40*; 3: *LvRpS6*; 4: *LvRpS3A*.

Os níveis de expressão de *LvCrus Ia* em hemócitos foram mínimos, de modo que sua quantificação não pôde ser mensurada por estar fora do limite de detecção dos iniciadores (dados não mostrados). No intestino médio, no entanto, os níveis de expressão aumentaram

consideravelmente nos animais inoculados com a bactéria e com o vírus, bem como com seus respectivos controles quando comparados ao grupo *naïve* (N). Em relação à infecção bacteriana, os níveis de expressão de *LvCrus Ia* aumentaram significativamente no grupo infectado (V+) e nos animais inoculados com água do mar estéril (V-), mostrando uma indução superior a 50 vezes ($P < 0,05$) em relação ao grupo *naïve* (N) (**Figura 16**). Em relação à infecção viral, não houve diferença estatística nos níveis de expressão, porém uma enorme variabilidade nos níveis transcricionais foi observada diante da injeção do inóculo livre do vírus (W-), bem como da infecção viral (W+) (**Figura 16**). Em nenhum dos casos pôde ser observada diferença de expressão entre os animais infectados e seus respectivos controles, sugerindo que o aumento nos níveis transcricionais de *LvCrus Ia* observados em ambos os tratamentos respondem mais à injúria do inóculo do que à infecção propriamente dita (**Figura 16**).

Figura 16. Perfil de expressão gênica de *LvCrus Ia* no intestino médio de *Litopenaeus vannamei* após 48 h de uma infecção experimental com a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi* ou com o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV).

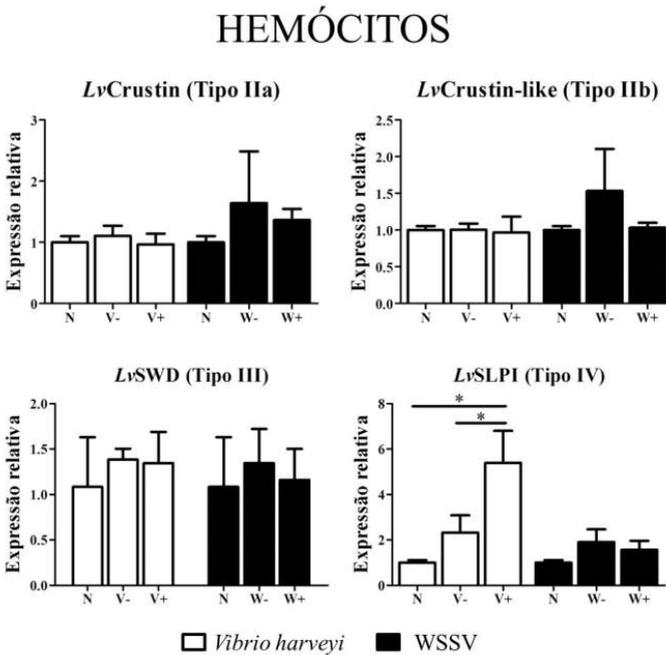


Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de triplicatas biológicas (3 *pools* de 5 animais por condição). As barras brancas indicam os níveis de expressão de *LvCrus Ia* no intestino médio de animais experimentalmente infectados com a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (6×10^7 CFU/animal) (V+) e inoculados com água do mar estéril (V-). As barras pretas indicam os níveis de expressão de *LvCrus Ia* no intestino médio de animais experimentalmente desafiados com o WSSV (3×10^2 cópias genômicas/animal) (W+) e injetados com o inóculo livre do vírus (W-). Asteriscos (*): diferenças estatísticas entre as condições experimentais

($P < 0,05$), obtidas através do teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey. N: animais *naïve* (não manipulados).

Adicionalmente, os níveis transcricionais dos demais Tipos de crustinas hemocitárias de *L. vannamei* (Tipos IIa, IIb, III e IV) foram investigados e avaliados unicamente nos hemócitos. A expressão das crustinas *LvCrustin* (Tipo IIa), *LvCrustin-like* (Tipo IIb) e *LvSWD* (Tipo III) não sofreu variações significativas em nenhuma das infecções bacterianas ou virais nem nos grupos infectados em relação aos seus respectivos controles (**Figura 17**). Os níveis de expressão de *LvSLPI* (Tipo IV), em contrapartida, foram modulados frente à infecção bacteriana com a bactéria Gram-negativa *V. harveyi* ATCC 14126. Um aumento de 5,37 vezes em relação ao grupo *naïve* (N) foi observado em animais após o desafio bacteriano (V+) e de 2,31 vezes em animais inoculados com salina (V-) (**Figura 17**). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis transcricionais dos grupos controle (N×V-), indicando que a expressão do gene respondeu especificamente à infecção bacteriana. Em relação à infecção viral, não foi detectada qualquer modulação nos níveis de expressão de *LvSLPI* (**Figura 17**).

Figura 17. Perfil de expressão gênica das crustinas *LvCrustin*, *LvCrustin-like*, *LvSWD* e *LvSLPI* nos hemócitos de *Litopenaeus vannamei* após 48 horas de uma infecção experimental com a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi* ou com o vírus da Síndrome da Mancha Branca



Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de triplicatas biológicas (3 *pools* de 5 animais por condição). As barras brancas indicam os níveis de expressão em hemócitos de animais experimentalmente infectados com a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (6×10^7 CFU/animal) (V+) e inoculados com água do mar estéril (V-). As barras pretas indicam os níveis de expressão em hemócitos de animais experimentalmente desafiados com o WSSV (3×10^2 cópias genômicas/animal) (W+) e injetados com o inóculo livre do vírus (W-). Asteriscos (*): diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$), obtidas através do teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey. N: animais *naïve* (não manipulados).

6. DISCUSSÃO

Crustinas são importantes efetores no sistema imune e que desempenham uma função primordial no combate a infecções por diversos agentes patogênicos. Essa família de AMPs parece estar restrita a algumas espécies de invertebrados do Clado Pancrustacea (crustáceos e alguns insetos) e, atualmente, está dividida em cinco principais grupos (referidos como Tipos I a V). Segundo a classificação de crustinas proposta por TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP (2015), membros dos Tipos I a IV são específicos de crustáceos, enquanto que os membros do Tipo V são aqueles encontrados apenas em formigas. Em camarões peneídeos, as crustinas do Tipo II representam o grupo de maior predominância e, até recentemente, as crustinas do Tipo I compunham o único grupo não encontrado no repertório imunológico desses animais. As crustinas do Tipo I eram descritas como exclusivas de crustáceos da Subordem Pleocyemata (caranguejos, siris, lagostas, lagostins) e, apenas muito recentemente, esse Tipo de crustinas foi identificado em camarões peneídeos (Subordem Dendrobranchiata) (DONPUDSA *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015b).

Neste trabalho, foram identificadas e caracterizadas, pela primeira vez, crustinas do Tipo I na espécie de camarão mais cultivada no mundo. Todas as sequências identificadas em *L. vannamei* possuem uma assinatura molecular característica das crustinas do Tipo I segundo os critérios estabelecidos por SMITH *et al.* (2008), ou seja, uma região N-terminal onde reside um domínio rico em resíduos de cisteína arranjados em posições definidas e um domínio WAP na extremidade C-terminal contendo oito resíduos de cisteína engajados em quatro ligações dissulfeto. Assim como as crustinas do Tipo II (Subtipos IIa e IIb), as crustinas do Tipo I de *L. vannamei* também constituem um grupo diverso de crustinas que incluem, pelo menos, dois Subtipos (*LvCrus* Ia e *LvCrus* Ib) com características estruturais, bioquímicas e transcricionais distintas. Ademais, este é o primeiro relato de membros aniônicos nessa família classicamente descrita como de peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) (ROSA; BARRACCO, 2010).

A identificação de crustinas do Tipo I em *L. vannamei* contribui com mais um registro em camarões peneídeos e ilustra a extensão da diversidade dessa família de AMPs que se reflete, inclusive, nas diferentes respostas transcricionais frente a infecções experimentais. No camarão *L. vannamei*, foram anteriormente descritas crustinas do Tipo

IIa ou *LvCrustins* (BARTLETT *et al.*, 2002; VARGAS-ALBORES *et al.*, 2004), Tipo IIb ou *Crustin-like* (um único depósito no GenBank: AFV77524), Tipo III ou *LvSWD* (JIMÉNEZ-VEGA *et al.*, 2004) e Tipo IV ou *LvSLPI* (= *LvDWD*) (JIMÉNEZ-VEGA; VARGAS-ALBORES, 2007). A descoberta de dois Subtipos de crustinas do Tipo I no camarão *L. vannamei* traz importantes implicações tanto em termos atividades biológicas quanto em diversidade molecular. Ainda que *LvCrus Ia* e *LvCrus Ib* compartilhem uma alta identidade aminoacídica, a presença de peptídeos sinal diferentes aliada às suas contrastantes propriedades bioquímicas como massa molecular e ponto isoelétrico teórico (*pI*) podem indicar que os dois Subtipos de crustinas estejam implicados em processos fisiológicos distintos e o silenciamento pós transcricional individual e conjunto desses dois grupos de crustinas pode ser uma interessante ferramenta na investigação dessas funções. Até o momento, pouco se conhece a respeito do espectro de atividade antimicrobiana das crustinas de *L. vannamei* e muito ainda precisa ser estudado para se entender o papel desses efetores na resposta imune desses camarões. O único estudo funcional realizado em *L. vannamei* mostrou que as crustinas do Tipo IIa estão envolvidas nas respostas de defesa (*in vivo*) contra bactérias do gênero *Vibrio* (SHOCKEY *et al.*, 2009). Essa descoberta confronta a maioria dos estudos *in vitro* que mostraram que a maioria das crustinas são ativas contra bactérias Gram-positivas e não contra bactérias Gram-negativas (vide revisão de SMITH *et al.*, 2008).

De maneira interessante, um dos Subtipos de crustinas do Tipo I de *L. vannamei* (*LvCrus Ia* – identificadas de bancos transcriptômicos de cordão nervoso) é composto por moléculas carregadas negativamente ($pI < 6$). Peptídeos antimicrobianos aniônicos (AAMPs) foram anteriormente descritos em outras famílias de AMPs de camarões peneídeos, como as stylicinas (LIU *et al.*, 2015a; ROLLAND *et al.*, 2010) e ALFs do Grupo D (ROSA *et al.*, 2013). Classicamente, os peptídeos antimicrobianos são moléculas catiônicas e a abundância de resíduos aminoacídicos ácidos (glutamato e aspartato) em sua composição resulta em uma redução de sua carga líquida que pode ser acompanhada de modificações na estrutura para garantir sua ação antimicrobiana. De fato, alguns AAMPs são fosforilados em resíduos aminoacídicos específicos a fim de garantir a estabilidade estrutural de sua forma ativa ou facilitar a ligação de íons metálicos divalentes importantes na interação com a superfície dos patógenos (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). Além disso, AAMPs isolados do trato respiratório de mamíferos ruminantes foram eficazes contra a bactéria

patogênica *Pasteurella haemolytica*, atuando especificamente em nível intracelular através da floculação de componentes citoplasmáticos (BROGDEN *et al.*, 1996). No entanto, interações com a membrana dos microrganismos ainda parece ser o mecanismo central de atuação desses peptídeos (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009).

A plasticidade funcional observada em AAMPs ilustra uma aparente diversidade em mecanismos de ação e, comparativamente aos CAMPs, retrata sua igual importância nos sistemas de defesa de eucariotos. Este trabalho, além de ser o primeiro relato de crustinas do Tipo I em *L. vannamei*, reporta também a primeira identificação de crustinas de natureza aniônica nesta espécie. Frente a esta novidade, é imprescindível a determinação do espectro de atividade antimicrobiana dessas crustinas, bem como sua eficiência no combate a microrganismos. Além disso, atividades antiproteolíticas foram identificadas unicamente em crustinas catiônicas dos Tipos III e IV (AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, 2008; CHEN; HE; XU, 2008; DU *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013; SUTHIANTHONG *et al.*, 2011) e, por esta razão, é importante investigar se a redução da carga líquida dessas proteínas é capaz de proporcionar a crustinas do Tipo I essa habilidade e, em caso positivo, se esta redução se reflete em maior ou menor grau nesta atividade. A expressão heteróloga de LvCrus Ia (mas também da crustina catiônica LvCrus Ib) representa uma importante ferramenta que poderá elucidar suas possíveis atividades biológicas, abrindo um rumo promissor de investigação de um novo grupo de crustinas nessa espécie.

O resultado das análises filogenéticas sugere que a classificação das crustinas seja muito maior que os cinco Tipos anteriormente propostos (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015) e que esta seja a mais diversa família de AMPs encontrada em crustáceos. Segundo os critérios de classificação das crustinas do Tipo I, correspondem a este grupo as sequências que possuem 12 resíduos de cisteína conservados (dos quais os 8 presentes na região C-terminal compreendem um domínio WAP) e nenhum domínio N-terminal rico em resíduos de glicina (SMITH *et al.*, 2008; TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). No entanto, nem todas as crustinas que apresentam essas características estruturais primárias agruparam-se no mesmo grupo das autênticas crustinas do Tipo I (Carcinina-like). Das cinco crustinas do camarão *M. japonicus* que foram classificadas como sendo do Tipo I (JIANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015b), apenas *MjCruI-1* e *MjCruI-2* correspondem realmente a

crustinas desta categoria. De maneira interessante, enquanto que a sequência *MjCruI-3* faz parte do grupo de crustinas semelhantes à PET-15 da lagosta *P. argus* (que abarca ainda as crustinas do Tipo V de insetos), as sequências *MjCruI-4* e *MjCruI-5* agruparam-se com outras sequências de crustinas que não apresentam um domínio WAP completo (designadas neste trabalho como “WAP *degenerated crustins*”). Neste mesmo grupo encontram-se ainda sequências de outras espécies de crustáceos e a *CarcininPm1* do camarão *P. monodon*, classificada por DONPUDSA *et al.* (2014) como uma crustina do Tipo I. De fato, para compor um determinado grupo, cada sequência precisa respeitar uma assinatura aminoacídica específica, assim, a atual classificação dos diferentes Tipos não contempla toda a diversidade molecular encontrada nessa família de AMPs. Na literatura, não existe ainda um consenso em relação a uma assinatura comum a todas as crustinas (SMITH *et al.*, 2008; TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015; ZHAO; WANG, 2008) e uma nomenclatura padronizada, como classicamente proposto para as peneidinas (GUEGUEN *et al.*, 2006). Essa falta de consenso compromete seriamente a classificação dos diferentes Tipos de crustinas em publicações científicas, como no caso das crustinas do Tipo I dos camarões *M. japonicus* (JIANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015b) e *P. monodon* (DONPUDSA *et al.*, 2014) e das crustinas de formigas, classificadas por TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP (2015) como “crustinas do Tipo V”. Assim, faz-se necessário uma análise detalhada em nível molecular, transcricional e funcional das diferentes crustinas do Clado Pancrustacea para a elaboração de uma classificação robusta e fundamentada que contemple a real diversidade presente nessa família de AMPs.

Toda a diversidade molecular encontrada para as crustinas de *L. vannamei* (Tipos Ia, Ib, IIa, IIb, III e IV) reflete-se também em termos transcricionais. Uma análise de expressão gênica foi realizada em diferentes tecidos de animais estimulados ou não com a bactéria *V. harveyi* a fim de se identificar os principais sítios de expressão de crustinas do Tipo I em *L. vannamei*. Surpreendentemente, a expressão das crustinas do Tipo I não foi detectada nos hemócitos circulantes, as quais parecem ser expressas majoritariamente nas brânquias e trato gastrointestinal. Este resultado mostra, pela primeira vez em *L. vannamei*, a presença de crustinas que não são predominantemente hemocitárias. No entanto, é imprudente excluir os hemócitos como um possível sítio de expressão, mas deve-se considerar pequena a sua participação na síntese desses peptídeos que aparentam ser expressos

nessas células em níveis transcricionais mínimos. Alternativamente, essas crustinas podem ser sintetizadas por populações hemocitárias específicas de brânquias. Em todo o caso, a localização da expressão dessas crustinas deve ser, no entanto, confirmada por técnicas complementares (hibridização *in situ* e/ou imunohistoquímica), como realizado para outros AMPs de camarões (MUÑOZ *et al.*, 2002; SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008).

Analogamente a outros AMPs, a grande maioria das crustinas é constitutivamente expressa nos hemócitos granulares circulantes (MUÑOZ *et al.*, 2002) e, frequentemente, em níveis elevados (GROSS; BARTLETT; BROWDY, 2001). No entanto, como observado para outras espécies de crustáceos decápodes, transcritos de diferentes Tipos de crustinas foram detectados em outros tecidos, desempenhando, inclusive, funções diferentes daquelas convencionalmente reportadas para essa família. A crustina PET-15, por exemplo, da lagosta *P. argus*, foi identificada unicamente em tecido epitelial em regeneração do órgão olfativo (STOSS *et al.*, 2004). Em camarões peneídeos, também foram identificadas crustinas não hemocitárias. Transcritos de CrustinPm5 (Tipo II) do camarão *P. monodon* foram detectados principalmente em epipoditos, pedúnculo ocular e, em menor grau, em brânquias de animais sadios, mas não em hemócitos (VATANAVICHARN *et al.*, 2009). No camarão *F. chinensis* foram detectados transcritos da crustina *Fc-Crus 3* no coração, estômago, intestino e ovários, sendo neste último observada uma expressão constitutiva em animais sadios e desafiados com a bactéria *V. anguillarum* (SUN *et al.*, 2010). No entanto, a expressão de *Fc-Crus 3* não foi detectada em hemócitos.

A presença marcante de transcritos de crustinas do Tipo I nas brânquias e intestinos de *L. vannamei* sugere um importante envolvimento desses AMPs na imunidade local não sistêmica, atuando ativamente na defesa dos epitélios e evitando a instalação de agentes invasores. De fato, o contato constante das brânquias com a água do mar carregada com uma infinidade de microrganismos potencialmente infecciosos representa uma verdadeira porta de entrada para o estabelecimento de patógenos e a presença de um arsenal imunológico em prontidão para o combate a tais infecções torna-se imprescindível. Outra importante porta de entrada para agentes infecciosos é o intestino, especialmente na região medial onde o revestimento quitinoso se torna menos espesso para facilitar a absorção dos nutrientes. Esta região torna-se, então, uma zona crítica para a penetração de bactérias e, por esta razão, não é surpreendente a detecção de transcritos de efetores

imunológicos como os AMPs nesses locais. Essa intrigante distribuição da expressão gênica de crustinas do Tipo I ressalta a versatilidade transcricional das crustinas de *L. vannamei* que pode ser refletida em uma variedade de funções distintas no organismo.

A presença de transcritos de crustinas do Tipo I no intestino de *L. vannamei* pode, ainda, estar implicada com a participação desses peptídeos no controle da microbiota intestinal. SOONTHORNCHAI *et al.* (2010) mostraram que diferentes genes associados ao sistema imune (em especial os AMPs) são expressos no trato gastrointestinal de camarões. Assim como ocorre nos hemócitos, que produzem e armazenam AMPs (MUÑOZ *et al.*, 2002; SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008), é possível que as células do epitélio intestinal estejam exercendo uma função similar, produzindo e liberando AMPs no lúmen do intestino para restringir um possível crescimento desenfreado das comunidades microbianas tanto comensal quanto patogênicas ali presentes. O controle de bactérias da microbiota endobionte presente na hemolinfa foi observado no camarão *M. japonicus*, no qual a expressão de diferentes AMPs é regida finamente por uma lectina do tipo C que atua diretamente na seleção dos microrganismos residentes nesse tecido (WANG *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que o silenciamento pós-transcricional (via RNA de interferência) do AMP ALFPm3 pode causar a morte de animais sadios devido ao aumento descontrolado da comunidade microbiana presente naturalmente na hemolinfa e no hepatopâncreas desses animais (PONPRATEEP *et al.*, 2012). Dessa forma, será de suma importância realizar estudos de genômica funcional para verificar se as crustinas do Tipo I de *L. vannamei* participam efetivamente na manutenção e/ou seleção das comunidades bacterianas associadas aos epitélios dos diferentes tecidos/órgãos dos camarões (em especial do trato gastrointestinal).

Apesar da confirmação da existência das crustinas do Tipo I de *L. vannamei* (identificadas em bancos transcriptômicos) por análises de expressão gênica, o sequenciamento dos transcritos deverá ser realizado a fim de confirmar a autenticidade nucleotídica das sequências encontradas. Um interessante rumo de investigação é avaliar se os dois grupos de crustinas do Tipo I encontrados (*LvCrus Ia* e *LvCrus Ib*) são codificados por genes diferentes ou advêm de um único gene cujo transcrito é processado para a geração de duas isoformas (alelos diferentes). Famílias multigênicas de AMPs em camarões são comuns e foram previamente descritas, como as peneidinas e os ALFs (GUEGUEN *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2013). As peneidinas, por

exemplo, que compõem uma importante família de AMPs encontrada ubiquamente em camarões peneídeos, são classificadas em quatro subgrupos distintos com base em suas composições aminoacídicas: PEN1/2, PEN3, PEN4 e PEN5 (CUTHBERTSON *et al.*, 2002; GUEGUEN *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2007), todos codificados por genes distintos. Um forte indício de que LvCrus Ia e Ib são derivados de genes distintos é a presença de peptídeos sinal diferentes para os dois grupos. LvCrus Ia apresenta um peptídeo sinal contendo 21-22 resíduos aminoacídicos com uma composição diferente dos 17 resíduos encontrados no peptídeo sinal de LvCrus Ib. No entanto, considerando a alta identidade aminoacídica observada na região comum aos dois grupos de crustinas, é admissível que sejam alelos de um mesmo gene ou que os dois possíveis genes sejam derivados de uma duplicação recente.

Crustinas são amplamente consideradas como efetores antimicrobianos e, com base nos estudos de suas propriedades antimicrobianas *in vitro*, participam das respostas de defesa de crustáceos, principalmente através da ação bactericida e antiproteolítica (AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, 2008; IMJONGJIRAK *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2008; SUPUNGUL *et al.*, 2008; SUTHIANTHONG *et al.*, 2011). No entanto, outras funções já foram atribuídas a essa família de AMPs e parece que seu espectro de atividades biológicas é mais amplo do que se imaginava. Estudos de expressão gênica mostraram que os níveis transcricionais de algumas crustinas foram modulados frente a fatores como estresse fisiológico (YUE *et al.*, 2010), reparo de lesões e regeneração tecidual sugerindo que esses AMPs podem estar relacionados a uma grande variedade de processos biológicos. Para investigar a participação das crustinas nas respostas de defesa de *L. vannamei*, os níveis transcricionais de diferentes Tipos foram avaliados em animais após infecções experimentais com dois patógenos de camarões: a bactéria Gram-negativa *V. harveyi* e o vírus causador da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Dos Tipos expressos em hemócitos, apenas a crustina LvSLPI (Tipo IV) mostrou-se induzida após 48 horas de uma infecção bacteriana. Por outro lado, a expressão gênica dos demais Tipos (IIa, IIB e III) não foi alterada por nenhum dos dois patógenos. Devido a problemas de ordem técnica, os níveis de expressão de LvCrus Ib não puderam ser quantificados no intestino médio dos animais infectados. Assim, fazem-se necessárias novas análises de expressão com novos iniciadores específicos para essa crustina do Tipo I. Igualmente, seria

importante avaliar a expressão de todos os Tipos em tempos mais precoces de infecção, em outros tecidos/órgãos (em especial para as crustinas do Tipo I) e também com outros microrganismos (como bactérias Gram-negativas e fungos filamentosos).

Neste trabalho, a expressão de *LvCru* Ia foi fortemente induzida no intestino médio de *L. vannamei* após uma injúria. Nos hemócitos de *L. vannamei*, os níveis de expressão de ALFs do Grupo B, C e D também se mostraram induzidos após uma injúria (ROSA *et al.*, 2013). No entanto, não houve diferença nos níveis transcricionais entre os animais experimentalmente desafiados com a bactéria *V. harveyi* e aqueles injetados com água do mar sugerindo que o drástico aumento observado nos níveis transcricionais responde mais à injúria do tratamento do que diretamente à infecção bacteriana. Por esta razão, é possível que crustinas do Tipo I possam estar igualmente envolvidas nos processos de regeneração tecidual e cicatrização. A participação de crustinas no reparo tecidual foi previamente identificada na lagosta *P. argus*, na qual STOSS *et al.* (2004) mostraram o envolvimento da crustina PET-15 na regulação da proliferação celular do epitélio do bulbo olfativo após uma abrasão experimental. Além disso, as crustinas parecem estar envolvidas ainda regulação pós-transcricional de citocinas envolvidas na manutenção da hematopoiese de camarões (CHANG *et al.*, 2013). É possível que a multifuncionalidade das crustinas possa ser justificada, em parte, pela presença de um domínio WAP em sua arquitetura molecular. Proteínas contendo domínio WAP foram largamente descritas em metazoários desempenhando as mais diversas funções, tais como as *wap*ri_{ns} encontradas no veneno de serpentes das famílias Elapidae e Colubridae e que apresentam atividades antimicrobianas (Fry *et al.*, 2008); as *chelonianins* identificadas na tartaruga *C. caretta* e que possuem capacidade de inibição de endopeptidases (SMITH, 2011) e as *perlwap*ri_{ns}, identificadas nos moluscos gastrópodes *Haliothis laevigata* (TRECCANI *et al.*, 2006) e *Haliothis arsinina* (MARIE *et al.*, 2010), envolvidas na formação da concha através do controle da deposição de cristais de cálcio.

Em resumo, este trabalho reporta pela primeira vez sequências de crustinas do Tipo I em *L. vannamei*, a espécie de camarão mais cultivada no mundo. As sequências, resgatadas em bancos transcriptômicos de cordão nervoso e hemócitos, compartilham uma alta identidade aminoacídica, mas formam dois Subtipos distintos que diferem em sua composição e, especialmente, em suas propriedades bioquímicas. Este trabalho relata, ainda, a primeira detecção de crustinas

aniônicas e não hemocitárias em *L. vannamei*. As crustinas do Tipo I responderam fortemente no intestino médio à injúria, mas não a infecções experimentais. É possível que essa indução esteja relacionada ao papel dessas proteínas em processos de regeneração tecidual e cicatrização. Porém, estudos funcionais devem ser realizados para confirmação dessa atividade. As crustinas representam, portanto, uma família de AMPs extremamente diversa e buscas de novas sequências em outros grupos de invertebrados, bem como o estudo de suas funções podem revelar ainda mais claramente a importância dessas moléculas nas defesas antimicrobianas desses animais.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

7.1. CONCLUSÕES

- Camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* possuem sequências codificantes para crustinas do Tipo I que formam dois subtipos: *LvCrus Ia* e *LvCrus Ib*;
- As crustinas do Tipo I compreendem um grupo diverso tanto em sequência quanto em propriedades bioquímicas (catiônicas e aniônicas);
- O presente trabalho traz a primeira identificação de crustinas de natureza aniônica e não hemocitárias em *L. vannamei*;
- As crustinas do Tipo I de *L. vannamei* respondem fortemente no intestino médio à injúria, mas não a infecções experimentais.

7.2. PERSPECTIVAS

- Confirmar a autenticidade das sequências codificantes para *LvCrus Ia* e *LvCrus Ib* por clonagem molecular e sequenciamento nucleotídico;
- Investigar o espectro de atividades biológicas *in vitro* através da expressão de *LvCrus Ia* e *LvCrus Ib* em sistemas recombinantes;
- Realizar o silenciamento pós-transcricional via RNA de interferência para investigar a participação de *LvCrus Ia* e *LvCrus Ib* na imunidade de *L. vannamei in vivo*;
- Localizar a expressão dos transcritos de *LvCrus Ia* e *LvCrus Ib* nos diferentes tecidos de *L. vannamei* pela técnica de hibridização *in situ*.

REFERÊNCIAS

- AMPARYUP, P.; DONPUDSA, S.; TASSANAKAJON, A. Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, p. 1497–509, jan. 2008.
- BACHERE, E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 149–168, abr. 2004.
- BARTLETT, T. C. et al. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 278–93, jun. 2002.
- BOSTOCK, J. et al. Aquaculture: global status and trends. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2897–912, 27 set. 2010.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–50, mar. 2005.
- BROGDEN, K. A. et al. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 1, p. 412–6, 1996.
- BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 169–184, abr. 2004.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CADORET, J. et al. Transient expression assays with the proximal

promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. **FEBS letters**, v. 460, p. 81–85, 1999.

CHANG, Y. T. et al. The New Face of the Old Molecules: Crustin $Pm4$ and Transglutaminase Type I Serving as RNPs Down-Regulate Astakine-Mediated Hematopoiesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

CHEN, D.; HE, N.; XU, X. Mj-DWD, a double WAP domain-containing protein with antiviral relevance in *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish immunology**, v. 25, n. 6, p. 775–81, dez. 2008.

CUTHBERTSON, B. J. et al. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics**, v. 54, n. 6, p. 442–5, set. 2002.

DE LA VEGA, E. et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): a broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1916–25, abr. 2008.

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, p. 28398–28406, 7 nov. 1997.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. et al. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, p. 20150300, 2016.

DONPUDSA, S. et al. Type I and type II crustins from *Penaeus monodon*, genetic variation and antimicrobial activity of the most abundant crustin $Pm4$. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 47, n. 1, p. 95–103, nov. 2014.

DU, Z.-Q. et al. A double WAP domain (DWD)-containing protein with proteinase inhibitory activity in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 154, n. 2, p. 203–10, out. 2009.

DU, Z.-Q. et al. A single WAP domain (SWD)-containing protein with antipathogenic relevance in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 1, p. 134–42, jan. 2010.

DU, Z.-Q.; YUAN, J.-J.; REN, D.-M. A novel single WAP domain-containing protein isoform with antibacterial relevance in *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, n. 2, p. 478–84, jun. 2015.

FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 166–73, jun. 2012.

GONCALVES, P. et al. Molecular signatures at imminent death: hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, fev. 2014.

GROSS, P.; BARTLETT, T.; BROWDY, C. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 565–577, 2001.

GUANÍ-GUERRA, E. et al. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1–11, abr. 2010.

GUEGUEN, Y. et al. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, n. 3, p. 283–8, jan. 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HANCOCK, R. E. ; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402–410, set. 2000.

HARRIS, F.; DENNISON, S.; PHOENIX, D. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. **Current Protein and Peptide Science**, v. 10, n. 6, p. 585–606, 2009.

HENNIGHAUSEN, L. G.; SIPPEL, A. E. Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of “four-disulfide core” proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 10, n. 8, p. 2677–2684, 1982.

IMJONGJIRAK, C. et al. Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 5, p. 841–850, 2009.

JIA, Y.-P. et al. A single whey acidic protein domain (SWD)-containing peptide from fleshy prawn with antimicrobial and proteinase inhibitory activities. **Aquaculture**, v. 284, n. 1-4, p. 246–259, nov. 2008.

JIANG, H.-S. et al. Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, n. 2, p. 387–95, abr. 2015.

JIMÉNEZ-VEGA, F. et al. A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, n. 3, p. 681–687, fev. 2004.

JIMÉNEZ-VEGA, F.; VARGAS-ALBORES, F. A secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI)-like protein from *Litopenaeus vannamei* haemocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 1119–26, nov. 2007.

JIRAVANICHPAISAL, P. et al. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 5, p. 441–55, jan. 2007.

KANG, C. J. et al. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 7, p. 1546–1554, 2007.

LI, F. et al. A double WAP domain-containing protein from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* with antimicrobial activities against Gram-negative bacteria and yeast. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 36, n. 1, p. 183–90, jan. 2012.

LI, S. et al. A double WAP domain-containing protein *Es-DWD1* from *Eriocheir sinensis* exhibits antimicrobial and proteinase inhibitory activities. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e73563, jan. 2013.

LIGHTNER, D. V et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174–83, jun. 2012.

LIU, H. T. et al. Identification and expression analysis of a novel stylicin antimicrobial peptide from Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 47, n. 2, p. 817–823, 2015a.

LIU, N. et al. A novel crustin from *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 49, n. 2, p. 313–22, abr. 2015b.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.

MARIE, B. et al. Proteomic analysis of the organic matrix of the abalone *Haliotis asinina* calcified shell. **Proteome Science**, v. 8, n. 1, p. 54, 2010.

MUÑOZ, M. et al. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 11, p. 2678–2689, 2002.

PONPRATEEP, S. et al. Gene silencing reveals a crucial role for anti-lipopolysaccharide factors from *Penaeus monodon* in the protection against microbial infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 1, p. 26–34, jan. 2012.

RANGANATHAN, S.; SIMPSON, K. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 3263, n. 99, p. 106–113, 1999.

RELF, J.; CHISHOLM, J. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **European Journal of Biochemistry**, v. 357, n. June, p. 350–357, 1999.

ROLLAND, J. L. et al. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 6, p. 1269–77, mar. 2010.

ROSA, R.; BARRACCO, M. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, p. 262–284, 2010.

ROSA, R. D. et al. Functional divergence in shrimp anti-lipopolysaccharide factors (ALFs): from recognition of cell wall components to antimicrobial activity. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67937, jan. 2013.

SHOCKEY, J. E. et al. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 5, p. 668–73, maio 2009.

SMITH, V. J. et al. Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 7, p. 758–72, jan. 2008.

SMITH, V. J. Phylogeny of whey acidic protein (WAP) four-disulfide core proteins and their role in lower vertebrates and invertebrates. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1403–8, 2011.

SOMBOONWIWAT, K. et al. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 10, p. 1170–1176, 2008.

SOONTHORNCHAI, W. et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 1, p. 19–28, 2010.

SPERSTAD, S. V et al. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 4, p. 583–91, abr. 2009.

STOSS, T. D. et al. Inducible Transcript Expressed by Reactive Epithelial Cells at Sites of Olfactory Sensory Neuron Proliferation. **Journal of Neurobiology**, v. 58, n. 3, p. 355–368, 2004.

SUN, C. et al. Molecular cloning and characterization of three crustins from the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 4, p. 517–524, 2010.

SUPUNGUL, P. et al. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 1, p. 61–70, jan. 2008.

SUTHIANTHONG, P. et al. A double WAP domain-containing protein PmDWD from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* is involved in the controlling of proteinase activities in lymphoid organ. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 3, p. 783–790, 2011.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–9, dez. 2013.

TASSANAKAJON, A.; SOMBOONWIWAT, K.; AMPARYUP, P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 48, n. 2, p. 324–41, fev. 2015.

TRECCANI, L. et al. Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals. **Biophysical Journal**, v. 91, n. October, p.

2601–2608, 2006.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

VARGAS-ALBORES, F. et al. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 138, n. 4, p. 415–22, ago. 2004.

VATANAVICHARN, T. et al. Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustin*Pm5*, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 153, n. 3, p. 244–52, jul. 2009.

WANG, X.-W. et al. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11779–90, 25 abr. 2014.

YUE, F. et al. Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 157, n. 3, p. 246–251, 2010.

ZASLOFF, M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 4, n. 1, p. 3–7, fev. 1992.

ZHANG, J. et al. Expression, purification, and characterization of recombinant Chinese shrimp crustin-like protein (Cru*Fc*) in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 5, p. 813–7, maio 2007.

ZHANG, Z.; ZHU, S. Comparative genomics analysis of five families of antimicrobial peptide-like genes in seven ant species. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 38, n. 2, p. 262–74, out. 2012.

ZHAO, X.; WANG, J. The antimicrobial peptides of the immune

response of shrimp. **Invertebrate Survival Journal**, p. 162–179, 2008.

ZHU, L. et al. *SpALF4*: a newly identified anti-lipopolysaccharide factor from the mud crab *Scylla paramamosain* with broad spectrum antimicrobial activity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, n. 1, p. 172–80, jan. 2014.

ANEXOS

PHILOSOPHICAL
TRANSACTIONS B

rstb.royalsocietypublishing.org



CrossMark
click for updates

Review

Cite this article: Destoumieux-Garzón D, Rosa RD, Schmitt P, Barreto C, Vidal-Dupiol J, Mitta G, Gueguen Y, Bachère E. 2016 Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Phil. Trans. R. Soc. B* **371**: 20150300. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0300>

Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease

Delphine Destoumieux-Garzón^{1,2,3,4}, Rafael Diego Rosa⁵, Paulina Schmitt⁶, Cairé Barreto⁵, Jeremie Vidal-Dupiol⁷, Guillaume Mitta^{1,2,3,4}, Yannick Gueguen^{1,2,3,4} and Evelyne Bachère^{1,2,3,4}

¹CNRS, ²Ifremer, ³UPVD, and ⁴Université de Montpellier, Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements (IHPE, UMR5244), Place Eugène Bataillon, 34090 Montpellier cedex, France

⁵Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

⁶Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Avenida Universidad 330, 2373223 Valparaíso, Chile

⁷Ifremer, UMR 241 EIO, LabexCorail, BP 7004, 98719 Taravao, Tahiti, French Polynesia

Artigo de revisão em coautoria (trabalho relacionado à dissertação de Mestrado).

ANEXOS

Fish & Shellfish Immunology 56 (2016) 123–126



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Short communication

A hemocyte-expressed fibrinogen-related protein gene (*LvFrep*) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Expression analysis after microbial infection and during larval development



Jaqueline da Rosa Coelho, Cairé Barreto, Amanda da Silva Silveira, Graziela Cleusa Vieira, Rafael Diego Rosa, Luciane Maria Perazzolo*

Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

Artigo científico em coautoria (não relacionado à dissertação de Mestrado).