

Gabriel Machado Matos

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NOVOS FATORES ANTI-
LIPOPOLISSACARÍDEOS (ALFs) DE CAMARÕES PENEÍDEOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis
2018

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

Matos, Gabriel Machado
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NOVOS FATORES ANTI
LIPOPOLISSACARÍDEOS (ALPs) DE CAMARÕES PENEÍDEOS /
Gabriel Machado Matos ; orientador, Rafael Diego da
Rosa, 2018.
85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biotecnologia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

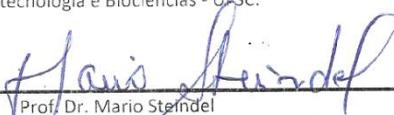
1. Biotecnologia e Biotecnologia. 2. Imunologia de
invertebrados. 3. Peptídeos antimicrobianos. 4.
Fatores Anti-Lipopolissacarídeos. I. Rosa, Rafael
Diego da . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
e Biotecnologia. III. Título.

“Caracterização molecular e avaliação da atividade antimicrobiana de novos fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) de camarões peneídeos”

Por

Gabriel Machado Matos

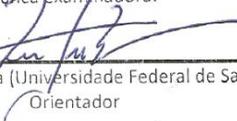
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (25/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e BioCiências - UFSC.



Prof. Dr. Mario Steinzel

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e BioCiências

Banca Examinadora:



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

Orientador



Dr. Hernán Francisco Terenzi (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Patrícia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 21 de Fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa por todos os ensinamentos nesses dois anos de trabalho conjunto. Agradeço pela excelente orientação e pela confiança a mim depositada. Tenho a mais sincera admiração pelo seu profissionalismo, dedicação e competência.

Agradeço aos membros da banca Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Hermes Stoco, Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi, Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto e Prof^ª. Dr^ª. Luciane Maria Perazzolo pela disponibilidade de avaliar este trabalho e pela contribuição prestada.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pela formação.

Agradeço às agências de fomento CAPES e CNPq pelo financiamento dos projetos que permitiram a realização deste trabalho, assim como pela bolsa fornecida.

Agradeço à Prof^ª. Dr^ª. Luciane Maria Perazzolo por toda contribuição na minha formação ao longo dos últimos dois anos. Além dos ensinamentos profissionais, aprendi muito sobre determinação e postura com nosso convívio.

Agradeço aos queridos colegas de trabalho que compõem ou compuseram o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura nesses últimos dois anos. Nesse ambiente aprendi o verdadeiro significado do trabalho em equipe. Com certeza essa jornada não teria sido tão prazerosa se não pudesse contar com a amizade de vocês.

Agradeço à Prof^ª. Dr^ª. Paulina Schmitt pela síntese dos peptídeos utilizados neste trabalho, assim como pelos ensinamentos na sua curta passagem pelo LIAA.

Agradeço ao Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC por todos os camarões cedidos para realização deste trabalho.

Agradeço à infraestrutura e ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC, em especial à Chirle Ferreira, Emily dos Santos e Vanessa da Silva pelo excelente atendimento prestado.

Agradeço aos colegas de corredor do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual pela companhia e ajuda prestada quando necessário.

Agradeço ao Prof. Dr. Giordano Calloni pelo auxílio com o estágio docência e experimentos realizados.

Agradeço às minhas colegas de mestrado Ana Gabriela Itokazu, Candice Boff, Mariana Becker e Thaís Alberti por compartilharem

comigo essa trajetória com muito companheirismo e risada. Não me imagino trilhando esse caminho sem nossos almoços de quarta-feira.

Agradeço a todos meus amigos que compartilharam comigo essa trajetória me mantendo motivado mesmo nos momentos difíceis. Agradeço em especial à Laura Freitas que sempre esteve do meu lado desde os dias de iniciação científica até os dias de escrita da dissertação.

Agradeço a Tomás Pessatti pela paciência, amizade, apoio e carinho nesses últimos anos. Agradeço por tudo o que representa na minha vida e por fazer meus dias mais felizes.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou e esteve do meu lado em todos os momentos. Agradeço em especial aos meus pais pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem a buscar os meus sonhos e por sempre acreditarem no meu potencial, mesmo quando eu duvidava de mim mesmo.

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos que participaram direta ou indiretamente da minha formação e execução deste trabalho.

RESUMO

Os Fatores Anti-lipopolissacarídeos (ALFs) compõem uma família diversa de peptídeos antimicrobianos (AMPs) que apresentam uma região entre cisteínas (estrutura β -hairpin) capaz de se ligar a componentes da superfície microbiana. A fim de investigar a implicação biológica da diversidade molecular encontrada nessa família de AMPs, novas sequências de ALFs foram identificadas em camarões peneídeos e caracterizadas em nível molecular, transcricional e funcional. As análises *in silico* realizadas com sequências provenientes de bancos de dados públicos mostraram que a diversidade de ALFs é maior do que o descrito até o momento, sendo encontrados pelo menos sete genes distintos de ALFs em camarões peneídeos (Grupos A a G). Neste trabalho, utilizando a espécie mais cultivada de camarão peneídeo (*Litopenaeus vannamei*), avaliou-se o perfil transcricional de ALFs em diferentes tecidos, frente infecções experimentais com dois patógenos não relacionados (a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi* e o vírus da Síndrome da Mancha Branca) e ao longo do desenvolvimento do camarão. Os ALFs de *L. vannamei* (*Litvan* ALF-A a -G) mostraram-se expressos em hemócitos e regulados diferencialmente em resposta às infecções experimentais. Além disso, alguns ALFs se mostraram presentes nos estágios larvais iniciais, sugerindo a participação desses AMPs no desenvolvimento do camarão. A atividade antimicrobiana de peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas (β -hairpin) dos novos ALFs identificados em *L. vannamei* (*Litvan* ALF-E a -G) foi avaliada contra diferentes microrganismos. Curiosamente, enquanto os peptídeos derivados de *Litvan* ALF-E e *Litvan* ALF-G se mostraram ativos contra bactérias Gram-positivas, peptídeos derivados de *Litvan* ALF-F se mostraram inativos contra os microrganismos testados. Em conjunto, esses resultados demonstram que os ALFs compõem uma família altamente diversa de AMPs de camarões peneídeos, em nível de sequência, expressão gênica e função.

Palavras-chave: crustáceos, peptídeos antimicrobianos (AMPs), sistema imune inato de invertebrados, diversidade molecular, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) comprise a diverse family antimicrobial peptides (AMPs) holding a central β -hairpin structure able to bind to microbial cell wall components. In order to explore the biological significance of the molecular diversity found in the ALF family, we have identified and characterized novel ALF members in penaeid shrimp and evaluated them at molecular, transcriptional and functional levels. *In silico* mining of publicly accessible databases revealed that the diversity of ALFs are not restricted to five members, but at least seven distinct ALF genes are found in penaeid shrimp (ALF Groups A to G). By using the most cultivated shrimp species (*Litopenaeus vannamei*) as a model organism, the transcriptional profile of shrimp ALFs were compared in terms of tissue distribution, gene expression response to two unrelated pathogens (the Gram-negative *Vibrio harveyi* and the White spot syndrome virus) and during shrimp development. *L. vannamei* ALFs (*Litvan* ALF-A to -G) showed to be expressed in hemocytes and differentially regulated in response to challenge. Besides, some ALF members were found to be transcribed in the first larval stages, suggesting the participation of these AMPs in shrimp development. Synthetic peptides based on the central β -hairpin of the novel ALFs identified in *L. vannamei* (*Litvan* ALF-E to -G) were tested against different microorganisms. Interestingly, while *Litvan* ALF-E and *Litvan* ALF-G β -hairpins showed to be active against Gram-positive bacteria, no activity was recorded for the synthetic β -hairpin of *Litvan* ALF-F. Altogether, our results showed that ALFs form a highly diverse family of shrimp AMPs, from sequence to expression regulation and function.

Keywords: crustaceans, antimicrobial peptides (AMPs), invertebrate immune system, molecular diversity, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das quatro classes de AMPs de acordo com a classificação baseada em sua composição aminoacídica e estrutura tridimensional.....	20
Figura 2 – Esquema ilustrativo dos principais mecanismos de ação dos AMPs.....	22
Figura 3 – Modelo estrutural do ALFP _{m3} do camarão <i>Penaeus monodon</i>	27
Figura 4 – Estágios do desenvolvimento do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> analisados neste estudo.....	34
Figura 5 – Alinhamento das sequências aminoacídicas dos ALFs de camarões peneídeos.....	44
Figura 6 – Árvore filogenética construída a partir do alinhamento dos peptídeos maduros de ALFs de camarões peneídeos e Scygonadinas.....	46
Figura 7 - Relação entre a massa molecular e o ponto isoelétrico teórico dos peptídeos maduros dos diferentes Grupos de ALFs encontrados em camarões peneídeos.....	48
Figura 8 – Modelos estruturais dos ALFs do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	50
Figura 9 – Alinhamento do peptídeo maduro de diferentes ALFs do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> com Penmon ALF-B1 do camarão <i>Penaeus monodon</i>	50
Figura 10 – Representação dos resíduos aminoacídicos envolvidos na ligação ao LPS nos diferentes Grupos de ALF.....	51
Figura 11 – Distribuição da expressão gênica dos ALFs de <i>Litopenaeus vannamei</i>	53
Figura 12 – Níveis de transcritos de ALFs (Grupos A a G) em hemócitos e intestino médio após 48 h de infecções experimentais.....	54
Figura 13 – Perfil transcricional de ALFs dos Grupos E, F e G ao longo do desenvolvimento do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	56
Figura 14 – Micrografias representativas dos testes de inibição do crescimento do fungo filamentosso <i>Fusarium oxysporum</i>	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Famílias de AMPs caracterizadas em camarões peneídeos.....	24
Quadro 2 – Sequência dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica.....	38
Quadro 3 – Sequência aminoacídica e massa molecular (MM) dos peptídeos sintéticos.....	39
Quadro 4 – Microrganismos e condições de cultivo.....	41
Quadro 5 – Caracterização molecular dos ALFs de camarões peneídeos.....	47
Quadro 6 – Espectro de atividade antimicrobiana de peptídeos sintéticos derivados dos ALFs dos Grupos E, Fe G de <i>Litopenaeus vannamei</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- aa – Resíduos aminoacídicos
- ALFs – Fatores anti-lipopolissacarídeos
- AMPs – Peptídeos antimicrobianos
- cDNA – DNA complementar
- CFU – Unidade formadora de colônia
- Cq – Ciclo de quantificação
- dNTPs - Deoxinucleotídeos trifosfatados
- DAMPs – Padrões moleculares associados a perigo
- DO₆₀₀ – Densidade óptica a 600 nm
- EST – *Expressed Sequence Tags*
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTA – Ácido lipoteicóico
- MAS – Solução de Alsever Modificada
- MBC – Concentração bactericida mínima
- MIC – Concentração inibitória mínima
- MM – Massa molecular
- M/PAMPs - Padrões moleculares associados a microrganismos/
patógenos
- pb – Pares de base
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PDB – *Protein Data Bank*
- PRPs - Receptores de reconhecimento padrão
- pI – Ponto isoelétrico teórico
- RT-PCR – Transcrição reversa seguida de PCR
- RT-qPCR - Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo
real
- TSA – *Transcriptome Shotgun Assembly*
- WGS – *Whole Genome Shotgun*
- WSSV – Vírus da Síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. HIPÓTESE.....	31
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Análises <i>in silico</i>	33
4.2. Animais	33
4.3. Coleta de tecidos.....	34
4.4. Infecções experimentais	35
4.5. Extração de RNA total e síntese de cDNA	36
4.6. Transcrição Reversa seguida de PCR convencional (RT-PCR).....	36
4.7. Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	37
4.8. Testes antimicrobianos	38
4.8.1. Peptídeos sintéticos	38
4.8.2. Microrganismos	39
4.8.3. Testes antibacterianos	40
4.8.4. Testes antifúngicos.....	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Identificação de novos ALFs em camarões peneídeos.....	43
5.2. Caracterização molecular dos ALFs de camarões peneídeos	47
5.3. Caracterização estrutural dos ALFs de <i>L. vannamei</i>	49
5.4. Distribuição da expressão gênica de ALFs em diferentes tecidos	52
5.5. Perfil de expressão gênica frente a infecções experimentais.....	52
5.6. Perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento	55
5.7. Espectro de atividade antimicrobiana dos novos ALFs de <i>L. vannamei</i>	57
6. DISCUSSÃO	59
7. PRINCIPAIS RESULTADOS	65
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	67
8.1. Conclusões	67
8.2. Perspectivas	67
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICES	79

1. INTRODUÇÃO

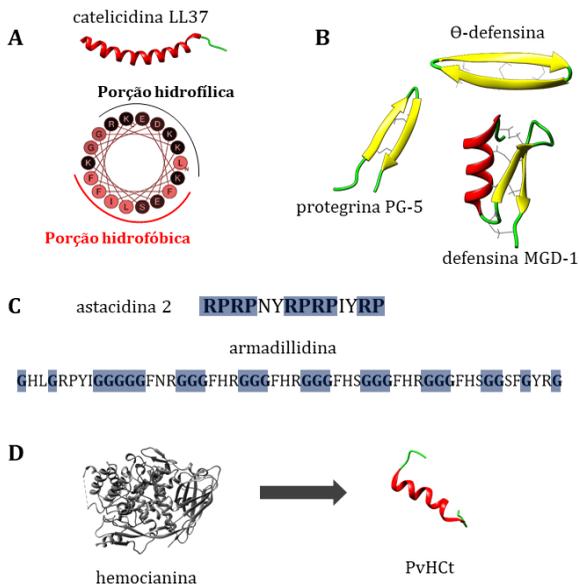
Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas efetoras associadas ao sistema imune inato, que apresentam diferentes funções imunes (HILCHIE; WUERTH; HANCOCK, 2013), sendo a atividade antimicrobiana a mais reconhecida. Essas moléculas compõem um grupo polifilético e são amplamente encontradas em organismos dos diferentes Reinos da vida. A partir da identificação dos primeiros AMPs na hemolinfa da mariposa *Hyalophora cecropia* (STEINER *et al.*, 1981), uma série de moléculas análogas foram descritas, revelando uma grande diversidade estrutural e funcional.

Os AMPs foram inicialmente caracterizados como pequenos peptídeos (<10 kDa) anfipáticos, com uma região hidrofílica catiônica, devido à presença em abundância de resíduos aminoácidos carregados positivamente (BULET; STOCKLIN; MENIN, 2004). No entanto, essa definição passou a não compreender toda a diversidade encontrada, dado que AMPs com caráter aniônico e de diferentes tamanhos têm sido amplamente caracterizados (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). Atualmente, um banco de dados com aproximadamente 3 mil sequências de AMPs está disponível (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) a fim de auxiliar na sistematização do conhecimento obtido acerca dessas moléculas e na identificação de novos AMPs. Devido à grande diversidade observada, diferentes formas de classificação dessas moléculas têm sido adotadas. De acordo com a sua composição aminoacídica e estrutura tridimensional, os AMPs são classificados em quatro grandes classes (**Figura 1**): (1) peptídeos anfipáticos em α -hélice linear, (2) peptídeos cíclicos, ou cíclicos com extremidades abertas, com uma ou mais ligações dissulfeto, (3) peptídeos ricos em um tipo particular de aminoácido e (4) peptídeos gerados a partir da hidrólise de moléculas precursoras (BULET; STOCKLIN; MENIN, 2004).

A síntese de AMPs ocorre em diferentes tecidos e tipos celulares de acordo com cada organismo analisado. Em insetos do gênero *Drosophila*, por exemplo, o corpo gorduroso é o principal tecido envolvido na síntese dessas moléculas, que são secretadas para a hemolinfa permitindo uma atuação sistêmica (TZOU *et al.*, 2000). Além do corpo gorduroso, foi demonstrado que o epitélio de revestimento do trato respiratório e do gastrointestinal desses animais também é capaz de produzir AMPs (TZOU *et al.*, 2000). Em contrapartida, em outros grupos de artrópodes como crustáceos e quelicerados, os AMPs são sintetizados majoritariamente em hemócitos e armazenados em grânulos

citoplasmáticos (ROSA; BARRACCO, 2010). É proposto que o armazenamento de AMPs em grânulos nos hemócitos pode contribuir para a eliminação de microrganismos fagocitados (DESTOUMIEUX *et al.*, 2000), de maneira similar às defensinas em neutrófilos humanos (SELSTED; OUELLETTE, 1995). Além disso, frente a estímulos microbianos, os grânulos dos hemócitos podem ser exocitados, liberando essas moléculas no plasma e nos sítios de infecção (DESTOUMIEUX *et al.*, 2000; IWANAGA; KAWABATA, 1998).

Figura 1 – Representação das quatro classes de AMPs de acordo com a classificação baseada em sua composição aminoacídica e estrutura tridimensional.



A. Peptídeos anfipáticos em α -hélice: modelo da catelicidina LL37 (PDB:2K6O) e esquema ilustrativo de α -hélice anfipática com porção hidrofílica em preto e porção hidrofóbica em vermelho. **B.** Peptídeos cíclicos, ou cíclicos com extremidades abertas, com uma ou mais ligações dissulfeto: modelos da Θ -defensina (PDB: 2LYF), protegrina PG-5 (PDB:2NC7) e defensina MGD-1 (PDB:1FJN). As cadeias laterais dos resíduos de cisteína envolvidos em ligações dissulfeto estão representados em cinza. **C.** Peptídeos ricos em um tipo particular de aminoácido: sequências aminoacídicas da astacidina 2 (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2007), rica em repetições de prolina e arginina e da armadillidina (HERBINIÈRE *et al.*, 2005), rica em resíduos de glicina. As regiões repetitivas estão destacadas em azul. **D.** Peptídeos gerados a partir da hidrólise de moléculas precursoras: modelos da hemocianina (PDB:1NOL) e do peptídeo gerado da sua porção C-terminal (PvHct; PDB:2N1C).

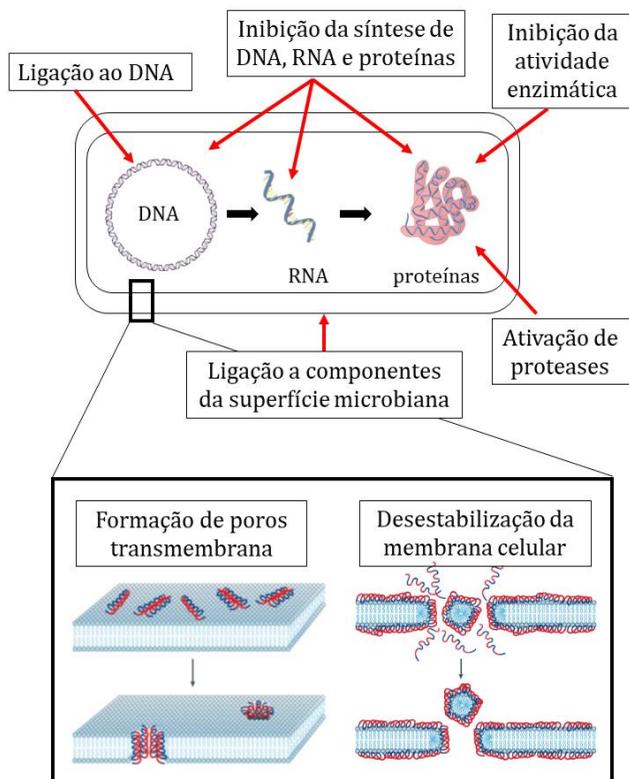
Os AMPs representam um importante mecanismo de defesa associado ao sistema imune inato de invertebrados e vertebrados. A resposta imune inata está vinculada ao reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos/patógenos (M/PAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (PRPs), que, por meio de cascatas de transdução de sinal, podem ativar a expressão de genes relacionados ao sistema imune, como os AMPs (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Apesar da diversidade encontrada em receptores e moléculas envolvidas na transdução do sinal nos diferentes grupos taxonômicos, a indução da expressão de genes codificantes para AMPs está vinculada à ativação da família NF- κ B/Rel de fatores de transcrição (SILVERMAN; MANIATIS, 2001). Em *Drosophila*, foi demonstrado que a expressão de AMPs é induzida de maneira específica pelas vias Toll e IMD, culminando na ativação de fatores de transcrição NF- κ B/Rel. Enquanto infecções por bactérias Gram-negativas induzem a expressão de AMPs pela via IMD, infecções por bactérias Gram-positivas e fungos induzem a expressão de AMPs pela via Toll (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Em outros artrópodes como os crustáceos, ainda não foi demonstrado quais vias atuam especificamente na indução da expressão de AMPs, no entanto, a regulação por fatores de transcrição NF- κ B/Rel se mantém conservada (WANG *et al.*, 2013).

O mecanismo de ação dos AMPs é bastante diverso e está relacionado essencialmente à composição aminoacídica e à estrutura tridimensional de cada molécula (**Figura 2**). Alguns AMPs atuam diretamente sobre a membrana celular dos microrganismos por interações eletrostáticas com os fosfolipídeos aniônicos causando a sua desestabilização (BROGDEN, 2005). Essas moléculas também podem se inserir na bicamada lipídica levando à formação de poros e, conseqüentemente, ao extravasamento do conteúdo intracelular (BROGDEN, 2005). Outros AMPs podem, ainda, se ligar a componentes da superfície microbiana ou serem interiorizados, inibindo vias metabólicas intracelulares essenciais ao microrganismo (BROGDEN, 2005; WILMES *et al.*, 2011)

O aparecimento de cepas de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionalmente utilizados se tornou um problema de saúde pública mundial (MCKENNA, 2013). Nesse cenário, devido à atividade rápida e eficiente contra um amplo espectro de microrganismos, os AMPs se destacam como moléculas com potencial biotecnológico capazes de auxiliar nessa problemática. O ambiente marinho é composto por uma grande diversidade de microrganismos, sendo esperado que animais adaptados a sobreviver nesse ambiente apresentem um arsenal

diverso de moléculas que atuam nas respostas de defesa. Dessa maneira, esses animais representam um interessante modelo de estudo a fim de identificar novas isoformas de AMPs que apresentem um amplo espectro de atividade antimicrobiana (CHOUDHARY *et al.*, 2017).

Figura 2 – Esquema ilustrativo dos principais mecanismos de ação dos AMPs.



Esquema ilustrativo representando uma célula bacteriana e os principais mecanismos de atuação dos AMPs. Em detalhe, estão representados os efeitos sobre a membrana celular. Adaptado de BROGDEN, (2005).

Em crustáceos, o primeiro AMP foi identificado na década de 90 no caranguejo *Carcinus maenas*, o qual mostrou-se ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SCHNAPP; KEMP; SMITH, 1996). Desde então, diferentes famílias de AMPs foram identificadas, principalmente em espécies cultiváveis como os camarões peneídeos, devido ao seu interesse econômico (ROSA; BARRACCO, 2010). O

cultivo de camarões peneídeos é uma importante prática em países do sudeste asiático, responsáveis por mais de 80% da produção mundial, e em países das Américas como o Brasil, México e Equador (FAO, 2016). No Brasil, o estado de Santa Catarina foi uma das principais regiões produtoras no início dos anos 2000, no entanto devido o aparecimento do vírus causador da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), a maioria das fazendas produtoras do estado foram fechadas (SEIFFERT *et al.*, 2006). Devido ao impacto causado por doenças infecciosas no cultivo desses animais, o estudo de AMPs de camarões peneídeos tem avançado não apenas para identificar moléculas com potencial biotecnológico, mas também para contribuir com a seleção de camarões mais resistentes a patógenos.

Em camarões peneídeos, atualmente são reconhecidas quatro famílias de AMPs codificadas por genes (**Quadro 1**): (1) as peneidinas, (2) as crustinas, (3) as stylicinas e (4) os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs). Além dessas famílias, o efeito antimicrobiano de peptídeos derivados de histonas (PATAT *et al.*, 2004), assim como de fragmentos da porção C-terminal da hemocianina (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2001) também foram descritos nesses animais.

As peneidinas foram os primeiros AMPs descritos em camarões peneídeos (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997). Essa família de AMPs é exclusiva de camarões da família Penaeidae e encontrada em abundância em hemócitos circulantes do camarão *L. vannamei* (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997). As peneidinas são AMPs catiônicos (4,7 - 7,2 kDa; *pI* aproximado de 9,0) que apresentam uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e arginina seguida de uma porção C-terminal composta por uma α -hélice anfipática e duas regiões em *coil* estabilizadas por três ligações dissulfeto (YANG *et al.*, 2003). Essa família de AMPs é dividida em quatro subgrupos (PEN1/2, PEN3, PEN4 e PEN5) codificados por genes distintos e com características bioquímicas distintas (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). A diversidade de sequências encontradas se reflete na ampliação do espectro de atividade antimicrobiana dessa família de AMPs. Enquanto os subgrupos PEN1/2, PEN3 e PEN4 apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos, o subgrupo PEN5 apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016).

Quadro 1 – Famílias de AMPs caracterizadas em camarões peneídeos.

AMP	Variante	MM em kDa e (carga)	Atividade	Regiões conservadas
Peneidinas	PEN1/2	4,71 - 6,12 (catiônica)	Anti-G(+) Antifúngica	
	PEN3	5,58 - 7,24 (catiônica)	Anti-G(+) Antifúngica	
	PEN4	5,23 - 5,37 (catiônica)	Anti-G(+) Antifúngica	
	PEN5	6,42 - 6,45 (catiônica)	Antibactérias Antifúngica	
Crustinas	Tipo I	9,34-17,79 (aniônica e catiônica)	Anti-G(-)	
	Tipo II	11,22 - 22,45 (catiônica)	Anti-G(+)	
	Tipo III	5,96 - 7,40 (catiônica)	Anti-G(+) Antiproteases	
	Tipo IV	10,93 - 11,14 (catiônica)	Antiproteases	
Stylicinas	I	8,9 (aniônica)	Antifúngica	
	II		não determinada	
ALFs	ALF-A	11,4 - 11,5 (aniônica e catiônica)	Antibactérias Antifúngica	
	ALF-B	10,6 - 11,2 (catiônica)	Antibactérias Antifúngica Antiviral	
	ALF-C	11,0 - 11,3 (catiônica)	Antibactérias Antiviral	
	ALF-D	10,7 - 10,8 (aniônica)	Baixa atividade antimicrobiana	
	ALF-E	11,4 - 12,5 (aniônica e catiônica)	Antibactérias	

PRP Domínio rico em prolina e arginina

CYS Domínio rico em cisteína

GLY Domínio rico em glicina

WAP Domínio WAP

HFB Região hidrofóbica

C-C Região entre cisteínas

MM: massa molecular. G(+): bactérias Gram-positivas. G(-): bactérias Gram-negativas. Adaptado de DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, (2016)

As crustinas são AMPs encontrados em diversos grupos de crustáceos, sendo que sequências homólogas foram identificadas também em genomas de insetos (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). Essa família é composta por peptídeos catiônicos e aniônicos (6 - 22 kDa; pI entre 5 e 8) e que contêm um domínio *Whey Acidic Protein* (WAP) (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). O domínio WAP foi identificado inicialmente em proteínas do leite de mamíferos, mas atualmente é encontrado em diversas proteínas de diferentes grupos taxonômicos estando associado a diferentes funções biológicas (RANGANATHAN *et al.*, 1999). Em crustáceos, as crustinas são classificadas em quatro grupos (Tipos I a IV), de acordo com os domínios encontrados na sua região N-terminal (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016; TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). A diversidade de domínios presentes nos diferentes Tipos de crustinas confere diferentes funções biológicas a esses AMPs. Enquanto as crustinas dos Tipos I e II apresentam principalmente uma função antimicrobiana, crustinas dos Tipos III e IV apresentam atividade antimicrobiana e/ou atividade antiproteases (AMPARYUP *et al.*, 2008; SUPUNGUL *et al.*, 2008; TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015).

As stylicinas são peptídeos exclusivamente aniônicos (8,9 kDa; pI 5) identificados inicialmente no camarão *Litopenaeus stylirostris* (ROLLAND *et al.*, 2010) e posteriormente identificadas na espécie *Marsupenaeus japonicus* (LIU *et al.*, 2015). Essa família de AMPs apresenta um domínio rico em prolina e arginina na porção N-terminal, seguido de uma região C-terminal contendo 13 resíduos de cisteínas (ROLLAND *et al.*, 2010). As stylicinas se mostraram ativas apenas contra o fungo filamentosso *Fusarium oxysporum*, no entanto apresentam alta afinidade de ligação a lipopolissacarídeos (LPS) e capacidade de aglutinar bactérias Gram-negativas *in vitro* (ROLLAND *et al.*, 2010).

Os ALFs compõem uma família de peptídeos antimicrobianos encontrada exclusivamente em quelicerados marinhos e crustáceos (classe Malacostraca), apresentando atividade contra uma grande diversidade de bactérias, fungos e alguns vírus envelopados (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). Os ALFs foram inicialmente isolados da hemolinfa dos limúlídeos *Limulus polyphemus* e *Tachypleus tridentatus* na década de 80 (TANAKA *et al.*, 1982). Esses animais apresentam um sistema de coagulação bastante sensível a pequenas concentrações de LPS presente nas bactérias Gram-negativas. Ao reconhecer o LPS, os receptores celulares dos hemócitos ativam uma cascata de sinalização que causa a liberação de grânulos contendo uma

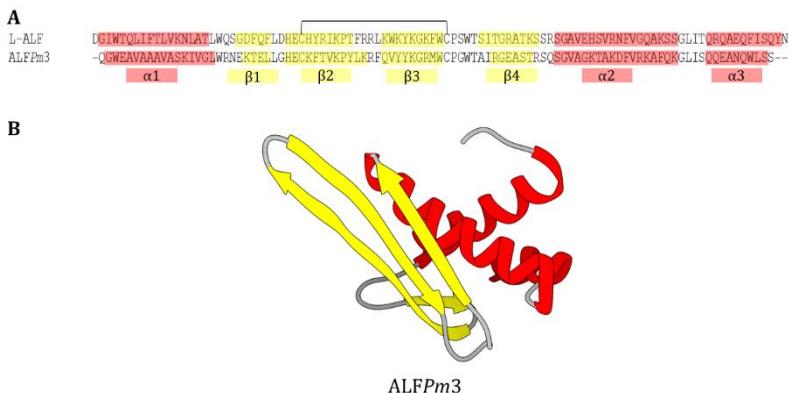
série de moléculas imunofetoras. Essas moléculas atuam tanto no processo de coagulação da hemolinfa, para contenção dos patógenos, assim como apresentam atividade antimicrobiana (IWANAGA, 2007). Analisando o lisado de hemócitos dos limulídeos, TANAKA *et al.* (1982) encontraram um peptídeo de aproximadamente 10 kDa capaz de inibir a cascata de coagulação da hemolinfa, o qual nomearam de fator anti-LPS (ou ALF). Posteriormente, testes de atividade biológica desse peptídeo evidenciaram uma potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas (MORITA *et al.*, 1985).

Em crustáceos, os primeiros ALFs foram identificados no começo dos anos 2000 em hemócitos de duas espécies de camarão, *Litopenaeus setiferus* (GROSS *et al.*, 2001) e *Penaeus monodon* (SUPUNGUL *et al.*, 2002) por meio da construção de bibliotecas de genes expressos em hemócitos. Posteriormente, com o avanço das técnicas de biologia molecular, novos ALFs foram identificados em outras espécies de camarões, lagostas, caranguejos e lagostins (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015).

As sequências de ALFs apresentam um peptídeo sinal seguido de um peptídeo maduro de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos. Esse peptídeo maduro possui uma região N-terminal hidrofóbica e dois resíduos conservados de cisteína, cuja ligação dissulfeto determina a região associada à ligação ao LPS. A região entre cisteínas assume um formato de grampo (*β -hairpin*) e normalmente é composta por resíduos de aminoácidos catiônicos (lisina/arginina) que interagem com as cargas negativas do lipídeo A do LPS (HOESS *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* comprovaram que peptídeos derivados da região entre cisteínas apresentam atividade antimicrobiana similar à molécula inteira (JIANG *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2013; NAGOSHI *et al.*, 2006;). YANG *et al.* (2009) propuseram o envolvimento de seis resíduos aminoacídicos carregados na ligação do ALFPm3 do camarão *P. monodon* ao lipídeo A do LPS, quatro deles encontrados na região entre cisteínas e dois na região flangeadora, reforçando a importância dessa região nas sequências de ALFs. Além de se ligar ao lipídeo A do LPS de bactérias Gram-negativas, alguns ALFs são capazes de ligar ao ácido lipoteicóico (LTA) de bactérias Gram-positivas (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008) e às β -glicanas dos fungos (SUN *et al.*, 2011), conferindo um amplo espectro de atividade à essa família de AMPs. Até o momento, apenas duas estruturas tridimensionais de ALFs foram resolvidas: a do L-ALF de *L. polyphemus* por cristalografia (HOESS *et al.*, 1993) e a do ALFPm3 de *P. monodon* por ressonância magnética nuclear (YANG *et al.*, 2009). Ambas as estruturas apresentam 3 α -hélices e 4 folhas- β , demonstrando que a

estrutura tridimensional dos ALFs é conservada nesses grupos taxonômicos (**Figura 3**).

Figura 3 – Modelo estrutural do ALFPm3 do camarão *Penaeus monodon*.



A. Alinhamento das seqüências aminoacídicas de ALFs com estrutura tridimensional resolvida: L-ALF do limúlideo *Limulus polyphemus* (HOESS *et al.*, 1993) e ALFPm3 do camarão *P. monodon* (YANG *et al.*, 2009). **B.** Modelo tridimensional de ALFPm3 (PDB: 2JOB). Em vermelho estão representadas as 3 α -hélices e em amarelo estão representadas as 4 folhas- β . Hifens (-) representam *gaps*. Os dois resíduos de cisteína estão ligados (\square) representando a ligação dissulfeto.

Em camarões peneídeos, os ALFs pertencem a uma família multigênica e atualmente cinco diferentes membros (ALFs Grupo A e E) foram descritos, com base na composição aminoacídica e nas suas características bioquímicas (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). O Grupo A de ALFs foi inicialmente descrito na espécie *P. monodon* por THARNTADA *et al.*, (2008). Os autores analisaram as seqüências nucleotídicas de 5 isoformas de *P. monodon* (ALFPm1-5) (SUPUNGUL *et al.*, 2004) e concluíram que as isoformas ALFPm1 e ALFPm2 pertenciam a um *locus* gênico (Grupo A) e as isoformas ALFPm3, ALFPm4 e ALFPm5 pertenciam a outro *locus* gênico (Grupo B). Além das seqüências descritas em *P. monodon*, o Grupo A é composto por seqüências de *L. vannamei* e *M. japonicus* de acordo com a classificação de ROSA *et al.* (2013) e JIANG *et al.* (2015). Os ALFs do Grupo A apresentam caráter levemente aniônico (ROSA *et al.*, 2013) e se mostraram envolvidos nas respostas de defesa *in vivo* de camarões frente a bactérias e fungos patogênicos (de la VEGA *et al.*, 2008).

Assim como descrito anteriormente, o Grupo B foi caracterizado inicialmente na espécie *P. monodon* por THARNTADA *et al.*, (2008). Os ALFs do Grupo B são moléculas altamente catiônicas, que apresentam amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos e vírus envelopados (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2013; SOMBOONWIWAT *et al.*, 2005). Estudos em diferentes espécies de camarões penéideos demonstraram que os ALFs do Grupo B são os mais expressos em hemócitos de animais sadios em relação aos outros Grupos de ALFs (ROSA *et al.*, 2013; SUPUNGUL *et al.*, 2002). Estudos *in vivo* demonstraram que o silenciamento pós-transcricional do ALFPm3 leva a morte do animal devido a um descontrole da microbiota (PONPRATEEP *et al.*, 2012). Devido à grande importância desse ALF no camarão *P. monodon*, uma série de estudos buscaram identificar sequências homólogas em outras espécies de camarões penéideos (ROSA *et al.*, 2013; de la VEGA *et al.*, 2008; ROSA; STOCO; BARRACCO, 2008; NAGOSHI *et al.*, 2006). Dessa forma, o Grupo B apresenta maior representatividade de sequências caracterizadas entre as espécies de camarões penéideos, sendo encontrado em *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Fenneropenaeus indicus*, *Fenneropenaeus chinensis*, *P. monodon* e *M. japonicus*.

O Grupo C foi descrito por PONPRATEEP *et al.* (2012) a partir da caracterização de ALFPm6 encontrada em bibliotecas de transcritos induzidos frente a infecção pelo *Yellow Head Virus* (PRAPAVORARAT; PONGSOMBOON; TASSANAKAJON, 2010). ROSA *et al.* (2013) e JIANG *et al.* (2015) identificaram e classificaram sequências correspondentes a esse Grupo nas espécies *L. vannamei* e *M. japonicus*, respectivamente. Os ALFs do Grupo C são moléculas catiônicas, que atuam na defesa antiviral e antibacteriana (PONPRATEEP *et al.*, 2012).

O Grupo D foi descrito inicialmente nas espécies *L. stylirostris*, *L. vannamei* e *Litopenaeus setiferus* (ROSA *et al.*, 2013). Esse Grupo foi o primeiro composto por ALFs de caráter aniônico que apresentavam baixa afinidade de ligação ao LPS e conseqüentemente uma baixa atividade antimicrobiana (ROSA *et al.*, 2013). Devido à ausência de sequências correspondentes em outras espécies ROSA *et al.* (2013) propuseram que esse Grupo fosse exclusivo de camarões do Pacífico. JIANG *et al.* (2015) foram os primeiros autores a identificar sequências do Grupo D na espécie oriental *M. japonicus*, indicando que esse Grupo não é exclusivo de camarões ocidentais. Até o momento, nenhum estudo foi realizado acerca do envolvimento desse Grupo nas respostas de defesa *in vivo*.

JIANG *et al.* (2015), identificaram duas novas sequências de ALFs em *M. japonicus* (*Mj*ALF-E1 e *Mj*ALF-E2) classificadas como Grupo E

devido à baixa identidade aos outros Grupos de ALFs descritos. Até o momento, nenhuma outra sequência do Grupo E foi caracterizada em outras espécies de camarões peneídeos e devido à baixa identidade observada entre as sequências *MjALF-E1* e *MjALF-E2* é provável que esse Grupo seja reclassificado caso sequências homólogas sejam identificadas (TASSANAKAJON *et al.*, 2018). Os ALFs do Grupo E se mostraram envolvidos nas respostas de defesa antibacterianas do camarão *M. japonicus* (JIANG *et al.*, 2015)

Os ALFs compõem uma família altamente diversa e, apesar do esforço de diferentes autores em classificar e identificar novas sequências de ALFs, observa-se que ainda existe uma grande lacuna de conhecimento acerca da diversidade encontrada em camarões peneídeos. Além da diversidade observada, os ALFs apresentam o maior espectro de atividade antimicrobiana observado em relação aos outros AMPs de camarões peneídeos. Além disso, estudos vêm apontando a utilização de ALFs como marcadores de resistência para seleção de camarões mais resistentes a infecções de patógenos aquícolas (LIU *et al.*, 2014; TASSANAKAJON *et al.*, 2018). Devido a essas características, os ALFs representam um interessante alvo de estudos a fim de identificar e caracterizar moléculas com aplicações diretas na aquicultura e com potencial biotecnológico para o desenvolvimento de antibióticos derivados de AMPs.

2. HIPÓTESE

Os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) de camarões peneídeos compõem uma família de peptídeos antimicrobianos (AMPs) diversa em termos de sequência, perfil de expressão gênica e espectro de atividade antimicrobiana.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar, molecular e funcionalmente, novos fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) em camarões peneídeos utilizando como modelo a espécie *Litopenaeus vannamei*.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar, classificar e caracterizar novos ALFs em camarões peneídeos;
- Determinar a distribuição da expressão gênica dos ALFs de camarões em diferentes tecidos de animais juvenis sadios da espécie *L. vannamei*;
- Caracterizar o perfil transcricional de ALFs frente a infecções experimentais por patógenos de interesse aquícola;
- Caracterizar o perfil transcricional de novos ALFs ao longo do desenvolvimento do camarão *L. vannamei*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas dos novos ALFs identificados em *L. vannamei*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análises *in silico*

A partir das sequências nucleotídicas e aminoacídicas de ALFs de camarões peneídeos disponíveis na literatura (JIANG *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2013) e no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), foi realizada uma busca por novos ALFs em bancos de dados públicos não anotados. As buscas foram feitas utilizando as ferramentas tBLASTx e tBLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nos bancos *Expressed Sequence Tags* (ESTs), *Transcriptome Shotgun Assembly* (TSA) e *Whole-Genome Shotgun Contigs* (WGS) escolhendo apenas sequências codificantes completas. Todas as sequências encontradas foram traduzidas utilizando a ferramenta ExPASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>). As sequências aminoacídicas deduzidas foram analisadas em relação à presença de peptídeo sinal pela ferramenta SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) enquanto que a predição do ponto isoelétrico teórico (pI) e da massa molecular (MM) dos peptídeos maduros foi realizada com a ferramenta ExPASy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>). As sequências aminoacídicas dos peptídeos maduros foram alinhadas utilizando a ferramenta ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) no programa BioEdit Sequence Alignment Editor 5.0.9 (HALL, 1999) e as árvores filogenéticas foram geradas com o programa MEGA 7 (TAMURA *et al.*, 2013). Para a construção da árvore filogenética, foi utilizado o método de Neighbor-Joining (*pairwise deletion*) com 1.000 replicatas (*bootstraps*) e o modelo de substituição de Poisson. A análise envolveu 60 sequências aminoacídicas e 111 sítios informativos no conjunto final de dados. Os modelos tridimensionais (3D) foram gerados com a ferramenta SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) a partir do alinhamento com a sequência ALFPm3 do camarão *P. monodon* (PDB: 2JOB; YANG *et al.*, 2009). Os modelos gerados foram visualizados com o programa UCSF Chimera 1.11 (PETTERSEN *et al.*, 2004) para a análise estrutural (estruturas secundárias e terciárias) e dos resíduos conservados, bem como para a produção das imagens.

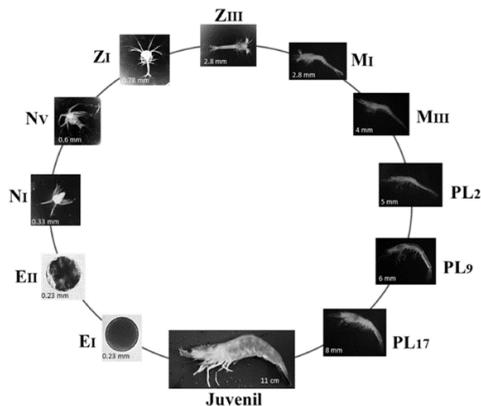
4.2. Animais

Camarões juvenis da espécie *L. vannamei* (10 ± 2 g), de ambos os sexos, foram cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC/CCA/LCM) do Departamento de Aquicultura da UFSC e transportados para o setor de aquários do Laboratório de Imunologia

Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA). Os animais foram mantidos em aquários com aeração constante e água salgada renovada diariamente em 50%. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial e aclimatados por pelo menos sete dias antes da realização dos experimentos.

As amostras de camarões em diferentes estágios do desenvolvimento foram cedidas e preparadas conforme descrito por QUISPE *et al.*, (2016). Cada estágio do desenvolvimento foi identificado microscopicamente e três amostras independentes de cada estágio foram coletadas. As amostras coletadas representam o começo e o fim de cada estágio do desenvolvimento: ovos fertilizados de 0-4 h (EI) e de 7-11 h pós-desova (EII), Náuplios I e V (NI e NV), Protozoas I e III (ZI e ZIII), Misis I e III (MI e MIII) e Pós-larvas com idade de 2, 9 e 17 dias (PL2, PL9 e PL17) (**Figura 4**).

Figura 4 – Estágios do desenvolvimento do camarão *Litopenaeus vannamei* analisados neste estudo.



EI: ovos fertilizados de 0-4 h pós-desova. **EII:** ovos fertilizados de 7-11 h pós-desova. **NI:** Náuplios I. **NV:** Náuplios V. **ZI:** Protozoa I. **ZIII:** Protozoa III. **MI:** Misis I. **MIII:** Misis III. **PL2:** Pós-larvas de 2 dias. **PL9:** Pós-larvas de 9 dias. **PL17:** Pós-larvas de 17 dias. Adaptado de QUISPE *et al.*, (2016).

4.3. Coleta de tecidos

Foram coletados oito diferentes tecidos/órgãos de três animais juvenis sadios: hemolinfa, músculo, brânquias, cordão nervoso, hepatopâncreas, intestino anterior (estômago), intestino médio, e intestino posterior. A hemolinfa foi extraída (*pool* dos três animais) da região ventral do abdome na presença da solução anticoagulante MAS (Solução

de Alsever Modificada: 115 mM glicose, 336 mM NaCl, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) na proporção de 1:2 (hemolinfa:MAS). Após a coleta, a hemolinfa foi centrifugada a 1.500 ×g por 10 min a 4°C e o precipitado celular, correspondente aos hemócitos, foi suspenso em 1 mL de TRIzol (ThermoFisher Scientific) para extração do RNA total. Em seguida, os camarões foram sacrificados por hipotermia (banho de gelo por 10 min) para coleta dos demais tecidos. Cada tecido foi coletado independentemente, lavado em solução Tris-NaCl gelada (10 mM Tris, 330 NaCl, pH 7,4) agrupado em *pools* (*pool* dos três animais) e macerados em 1 mL de TRIzol (ThermoFisher Scientific) com auxílio de pistilos estéreis. Os macerados obtidos foram centrifugados a 12.000 ×g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram armazenados a -20°C para extração de RNA total.

4.4. Infecções experimentais

As infecções experimentais foram realizadas com dois patógenos de interesse aquícola: a bactéria Gram-negativa *V. harveyi* ATCC 14126 e o vírus causador da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Para a infecção bacteriana, os animais (n=30) foram injetados intramuscularmente, entre o primeiro e segundo segmentos abdominais da região dorsal, com 100 µL do inóculo bacteriano [6×10^7 unidades formadoras de colônia (CFU)/animal] suspenso em água do mar filtrada. A dose utilizada foi previamente padronizada como capaz de matar 50% dos animais infectados em dois dias (SILVEIRA *et al.*, 2018). Como controle, foram utilizados animais não-estimulados (n=15; Grupo “*Naïve*”) e animais injetados com água do mar filtrada (n=15; Grupo “*Salina*”).

O preparo do inóculo viral foi realizado segundo o protocolo adaptado de GONCALVES *et al.*, (2014) a partir de tecido muscular de camarões diagnosticados positivos para o WSSV. Para as infecções virais, os animais (n=15) foram injetados intramuscularmente, entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais da região dorsal, com 100 µL do inóculo viral (3×10^2 partículas virais/animal). A dose utilizada foi previamente padronizada como capaz de matar 50% dos animais infectados em sete dias (SILVEIRA *et al.*, 2018). Como controle; foram utilizados animais não-estimulados (n=15; Grupo “*Naïve*”) e animais injetados com tecido muscular de camarões livres de WSSV (n=15; Grupo “*WSSV-free*”).

Após os desafios, os animais foram mantidos em condições controladas por 48 h até a realização da coleta da hemolinfa e do intestino

médio. A coleta dos tecidos foi realizada em 3 *pools* de 5 animais/condição, conforme descrito no item 4.3.

4.5. Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para extração de RNA total, adicionou-se clorofórmio nas amostras armazenadas em TRIzol (ThermoFisher Scientific) seguido de uma centrifugação a 12.000 $\times g$ por 15 min a 4°C. O RNA total foi precipitado com isopropanol e lavado duas vezes com etanol 75% gelado. O RNA obtido foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases e tratado com 1 U da enzima DNase I (ThermoFisher Scientific) a 37°C por 15 min, para a eliminação de possível DNA genômico contaminante. Em seguida, a enzima foi inativada a 65°C por 10 min na presença de 4,5 mM EDTA e as amostras de RNA precipitadas com 0,3 M acetato de sódio (pH 5,2) e isopropanol (1:1; v:v). Finalmente, o RNA total foi lavado com etanol 75% gelado e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases. A quantificação do RNA total extraído foi feita por espectrofotometria (NanoVue Plus), enquanto que a integridade das amostras foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), foi realizada a transcrição reversa de 1 μg de RNA total utilizando o kit RevertAid Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

4.6. Transcrição Reversa seguida de PCR convencional (RT-PCR)

As reações de Transcrição Reversa seguida de PCR convencional (RT-PCR) foram realizadas utilizando-se 1 μL de cDNA (diluído 10 vezes), 0,2 μM de cada iniciador (**Quadro 2**), 0,4 mM de dNTP Mix, 2 mM de $MgCl_2$ e 1 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Sinapse Biotecnologia). Para a amplificação das sequências de ALFs, foi realizada uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 30 ou 35 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturação, 60°C por 30 s para hibridização dos iniciadores e 72°C por 30 s para extensão e, por fim, uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min. O gene da β -actina (**Quadro 2**) foi utilizado como controle de expressão e de qualidade das amostras. Para a amplificação da sequência da β -actina, foi realizada uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 40 s, 56°C por 40 s e 72°C por 40 s e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio (0,5 $\mu g/mL$).

4.7. Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

As reações de Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas utilizando-se o sistema StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em duplicata, utilizando 1 μ L de cDNA (diluído 8 vezes para amostras dos estágios de desenvolvimento, 10 vezes para amostras de hemócitos e 20 vezes para amostras de intestino médio), 0,2 μ M de cada iniciador (**Quadro 2**) e 7,5 μ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2 \times (ThermoFisher Scientific). Ao término dos ciclos, foi realizada uma curva de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s) das amostras para verificar a especificidade dos iniciadores.

Para o cálculo de expressão relativa foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Nas análises de expressão gênica ao longo do desenvolvimento, os resultados foram normalizados pela média geométrica de dois genes de referência (*LvActina* e *LvRpS6*; **Quadro 2**) e calibrados com os valores de ΔCq de amostras de hemócitos de animais juvenis. Nas análises de expressão gênica frente a infecções experimentais, os resultados foram normalizados pela média geométrica dos genes *LvL40* e *LvEF1 α* (**Quadro 2**) e calibrados com os valores de ΔCq do grupo “*Naïve*” (animais não-estimulados).

Os dados de RT-qPCR foram analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey no programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando as variações de expressão se mostraram superiores a 1,5 vezes e com valor de $P < 0,05$. Os *heat maps* utilizados para representar os valores de expressão relativa nos experimentos de infecção experimental foram construídos com o programa *MultiExperiment Viewer* (MeV) (<http://www.tm4.org/>). Os gráficos de expressão relativa ao longo do desenvolvimento foram gerados no programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software).

Quadro 2 – Sequência dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica.

Gene	Referência [n° GenBank]	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Produto de amplificação
β -actina	CADORET <i>et al.</i> , (1999) [AF300705]	S:TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG AS:TCACCAACTGGGATGACATGG	846 pb
β -actina	WANG <i>et al.</i> , (2007) [AF300705]	S:CCACGAGACCACCTACAAC AS:AGCGAGGGCAGTGATTTC	142 pb
LvEF1 α	de la VEGA <i>et al.</i> , (2008) [GU136229]	S:TGGCTGTGAACAAGATGGACA AS:TTGTAGCCACCTTCTTGACG	103 pb
LvL40	SILVEIRA <i>et al.</i> , (2018) [KJ831563]	S:GAGAATGTGAAGGCCAAGATC AS:TCAGAGAGAGTGCACCATC	104 pb
LvRpS6	GONCALVES <i>et al.</i> , (2014) [FE080516]	S:AGCAGATACCCTTGGTGAAG AS:GATGCAACCACGGACTGAC	193 pb
Litvan ALF-A	ROSA <i>et al.</i> , (2013) [EW713395]	S:CTGATTGCCTTTGTGCCACG AS:TGACCCATGAACCTCCACCTC	113 pb
Litvan ALF-B	ROSA <i>et al.</i> , (2013) [GQ227486]	S:GTGTCTCCGTGTTGACAAGC AS:ACAGCCCAACGATCTTGCTG	123 pb
Litvan ALF-C	ROSA <i>et al.</i> , (2013) [FE058235]	S:ATGCGAGTGTCTGTCCTCAG AS:TGAGTTTGTTCGGCATGGCC	115 pb
Litvan ALF-D	ROSA <i>et al.</i> , (2013) [FE151634]	S:TGTGTTGGTTGTGGCACTGG AS:CAACGAGGTCAATGTCACCG	131 pb
Litvan ALF-E	Presente estudo [FE069658]	S:TGCTACGTGAATGCGACTCC AS:CGCTTCCCTTCCGACAATG	100 pb
Litvan ALF-F	Presente estudo [KJ000049]	S:AAGCTCTCATTCTGGTCCG AS:GGGTGTAACGAAGTACGTGC	180 pb
Litvan ALF-G	Presente estudo [FE153496]	S:CCGCTGCATGTCAAGTATCC AS:TCAGCAGTAGCAGTCTCAGC	140 pb

LvRpS6 e **LvL40**: proteínas ribossômicas S6 e L40, respectivamente. **LvEF1 α** : fator de Elongação 1- α . **S**: sequência do iniciador senso. **AS**: sequência do iniciador anti-senso. **pb**: pares de base.

4.8. Testes antimicrobianos

4.8.1. Peptídeos sintéticos

Peptídeos derivados da região entre cisteínas (*central β -hairpin*) dos novos ALFs identificados em *L. vannamei* (Litvan ALF-E, Litvan ALF-F e Litvan ALF-G) foram sintetizados quimicamente em parceria com a Dra. Paulina Schmitt do *Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular* da *Pontificia Universidad Católica de Valparaíso* (Valparaíso, Chile). Os peptídeos foram sintetizados no equipamento *Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer* (CEM Corporation) a partir de aminoácidos com grupamentos 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) (Iris Biotech GmbH) em resina *Rink Amide AM 0.6 meq/g* (Chem-Immpex). Os peptídeos sintéticos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com gradiente de acetonitrila (0 a 70%) em fluxo de 1 mL/min por 30 min. Por fim, os peptídeos foram liofilizados e analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) para confirmar a massa molecular (**Quadro 3**). Os peptídeos liofilizados foram suspensos em água ultrapura estéril na concentração estoque de 1 mM e estocados a -20°C até o uso.

Quadro 3 – Sequência aminoacídica e massa molecular (MM) dos peptídeos sintéticos.

Peptídeo	Sequência aminoacídica	MM
<i>Litvan</i> ALF-E ₃₂₋₅₃	GCVVNRSPYLKKFEVHYRADVKCG	2,833 kDa
<i>Litvan</i> ALF-F ₃₀₋₅₁	GCTYFVTPKVKVSFELYFKGRMTCG	2,763 kDa
<i>Litvan</i> ALF-G ₃₄₋₅₅	GCSYSTRPYFLRWRLKFKSKVWCG	2,969 kDa

4.8.2. Microrganismos

As cepas de cada microrganismo, o meio de cultura utilizado e a temperatura para crescimento estão disponíveis no **Quadro 4**. Todos os microrganismos utilizados fazem parte do cepário do LIAA e estavam estocados a -80°C em seus respectivos meios de cultura acrescidos de 15% de glicerol.

As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* e *Aeromonas salmonicida* foram cultivadas em meio “*Lysogeny Broth*” (LB), as bactérias do gênero *Vibrio* foram cultivadas em meio LB-NaCl 3% e as bactérias marinhas *Microbacterium maritypicum* e *Brevibacterium stationis* foram cultivadas em meio Zobell. As culturas foram incubadas *overnight* em temperatura própria para crescimento sob agitação constante. Para isolamento de colônias, as culturas foram semeadas em meio de cultura sólido (meio próprio para crescimento acrescido de ágar 15 g/L) e incubadas *overnight* em temperatura própria para crescimento (*M. maritypicum*, *B. stationis*, *A. salmonicida* e bactérias do gênero *Vibrio* foram incubadas por 48 h).

A levedura *Candida albicans* foi cultivada em meio Sabouraud por 48 h a 28°C sob agitação constante. Após crescimento, a cultura foi isolada em meio sólido (meio Sabouraud acrescido de ágar 15 g/L) e incubada por 48 h a 28°C.

O fungo filamentosso *Fusarium oxysporum* foi cultivado em meio “*Potato Dextrose Agar*” (PDA) por 10 dias a 30°C, protegido da luz. Para isolamento dos esporos, foi adicionado água ultrapura estéril sobre a cultura e realizada a raspagem da superfície das colônias. A suspensão de esporos resultante foi filtrada em gaze dupla esterilizada para remoção do micélio e então centrifugada a 500 ×g por 10 min. O precipitado de esporos foi lavado duas vezes com solução Tris-NaCl estéril e sua concentração ajustada para 10⁷ esporos/mL.

4.8.3. Testes antibacterianos

A fim de avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos peptídeos sintetizados, foram realizados testes de concentração inibitória mínima (MIC), segundo protocolo adaptado de DESTOUMIEUX *et al.*, (1999).

Uma única colônia isolada de cada bactéria foi cultivada em meio de cultura e temperatura própria. Após crescimento, a cultura foi diluída 100 vezes em meio de cultura fresco e posta para crescer novamente até atingir uma densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) entre 0,1 e 0,2. Atingida essa DO, a suspensão microbiana foi diluída 100 vezes em meio com poucos nutrientes (PB ou PB-NaCl 3% ou Zobell 1/3; **Quadro 4**) e então utilizada para o teste de MIC. Os testes de MIC foram realizados em microplacas de 96 poços, contendo 90 μ L da suspensão bacteriana diluída em meio com poucos nutrientes e 10 μ L do peptídeo sintético em diferentes concentrações (40, 20, 10 e 5 μ M). Os ensaios foram realizados em duplicatas, utilizando água ultrapura estéril (solução de suspensão dos peptídeos) como controle negativo da atividade. As placas foram incubadas em temperatura ótima de crescimento (**Quadro 4**) sob agitação leve por 24 h e a inibição do crescimento foi medida por espectrofotômetro a 595 nm. A concentração inibitória mínima foi determinada como o a concentração de peptídeo capaz de inibir 100% do crescimento microbiano.

A fim de avaliar o efeito bacteriostático ou bactericida do peptídeo, os poços em que foi observada a inibição do crescimento foram semeados em meio sólido rico em nutrientes. Nas placas em que foram observadas unidades formadoras de colônia, o efeito do peptídeo foi considerado como bacteriostático, enquanto que, nas placas em que não foram observadas colônias, o efeito foi considerado como bactericida.

Quadro 4 – Microorganismos e condições de cultivo.

Microorganismos	Meio de cultivo	Meio para teste	Temperatura
Bactérias Gram-positivas			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	LB	PB	37°C
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	LB	PB	37°C
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	LB	PB	37°C
<i>Micrococcus luteus</i> CIP 5345	LB	PB	30°C
<i>Microbacterium maritropicum</i> CIP 105733	Zobell	Zobell 1/3	30°C
<i>Brevibacterium stationis</i> CIP 101282	Zobell	Zobell 1/3	30°C
Bactérias Gram-negativas			
<i>Escherichia coli</i> SBS363	LB	PB	37°C
<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 9027	LB	PB	30°C
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 33658	LB	PB	30°C
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	LB-NaCl 3%	PB NaCl 3%	20°C
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749	LB-NaCl 3%	PB-NaCl 3%	20°C
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264	LB-NaCl 3%	PB-NaCl 3%	20°C
<i>Vibrio nigripulchritudo</i> CIP103195	LB-NaCl 3%	PB-NaCl 3%	28°C
Fungos			
<i>Candida albicans</i> MDM8	Sabouraud	Sabouraud	28°C
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	PDB 1/2	30°C

LB: peptona bacteriológica 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L, pH 7,2.

LB-NaCl 3%: peptona bacteriológica 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 30g/L, pH 7,2.

PB: peptona bacteriológica 10 g/L; NaCl 10 g/L, pH 7,2.

PB-NaCl 3%: peptona bacteriológica 10 g/L; NaCl 30 g/L, pH 7,2.

Zobell: peptona bacteriológica 4 g/L; extrato de levedura 1 g/L; NaCl 23,4 g/L; KCl 1,5 g/L; MgSO₄ 1,2 g/L; CaCl₂ 0,2 g/L, pH 7,2.

Zobell 1/3: peptona bacteriológica 1,33 g/L; extrato de levedura 0,33 g/L; NaCl 23,4 g/L; KCl 1,5 g/L; MgSO₄ 1,2 g/L; CaCl₂ 0,2 g/L, pH 7,2.

Sabouraud: peptona bacteriológica 10 g/L; dextrose 40 g/L pH 5,6.

PDA: *Potato Dextrose Agar* (KASVI), 42 g/L, pH 5,6.

PDB 1/2: *Potato Dextrose Broth* (KASVI), 13,5 g/L, pH 5,1.

4.8.4. Testes antifúngicos

O teste de atividade contra *C. albicans* foi realizado de maneira similar ao com bactérias. O preparo da cultura e do teste de MIC foram realizados conforme descrito na seção 4.8.3. As placas foram incubadas a 28°C sob agitação leve por 48 h e a inibição do crescimento foi medida por espectrofotômetro a 595 nm.

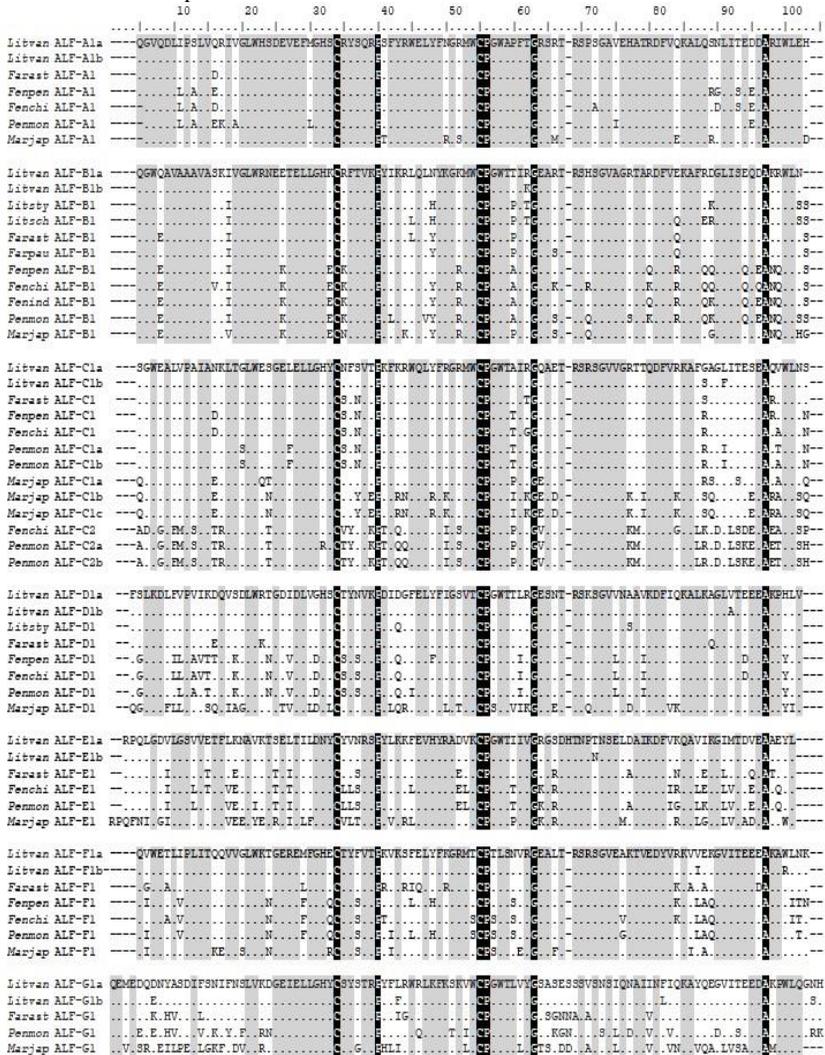
O teste com o fungo filamentosso *F. oxysporum* foi realizado a partir de esporos isolados. Para o teste de MIC, 10 µL de solução contendo 10⁷ esporos/mL foi diluído em 10 mL de meio “*Potato Dextrose Broth*” (PDB 1/2; **Quadro 4**) e o teste foi realizado conforme descrito na seção 4.8.3. As placas foram incubadas em câmara úmida protegida da luz a 30°C por 72 h e a inibição do crescimento dos esporos foi verificada em microscópio invertido OLYMPUS IX83 (Olympus, Life Sciences).

5. RESULTADOS

5.1. Identificação de novos ALFs em camarões peneídeos

Apesar do esforço de alguns autores em classificar as sequências de ALFs de crustáceos, muitas sequências identificadas seguem padrões diferentes de nomenclatura, dificultando o estudo comparativo entre ALFs de diferentes grupos taxonômicos. A fim de contribuir com o conhecimento acerca da diversidade de ALFs em camarões peneídeos, análises *in silico* foram realizadas buscando novas sequências não anotadas de ALFs em bancos de dados públicos e classificando as sequências previamente descritas na literatura. As buscas em bancos de dados anotados (GenBank) e não anotados (EST, TSA e WGS) resultaram na identificação de 57 sequências completas de ALFs (CDS completa) em 10 espécies de camarões peneídeos: *L. vannamei* (n=14), *Litopenaeus stylirostris* (n=2), *Litopenaeus schmitti* (n=1), *Farfantepenaeus paulensis* (n=1), *Farfantepenaeus aztecus* (n=7), *Fenneropenaeus chinensis* (n=7), *Fenneropenaeus indicus* (n=1), *Fenneropenaeus penicillatus* (n=5), *P. monodon* (n=10) e *M. japonicus* (n=9) (**Apêndice 1**). As sequências nucleotídicas foram traduzidas e os peptídeos maduros alinhados (**Figura 5**) a fim de classificá-los nos cinco Grupos previamente descritos de ALFs de camarões peneídeos: Grupo A a Grupo E (JIANG *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2013; PONPRATEEP *et al.*, 2012; THARNTADA *et al.*, 2008). Das 57 sequências recuperadas, 7 corresponderam ao Grupo A, 11 ao Grupo B, 13 ao Grupo C, 8 ao Grupo D, 6 ao Grupo E e 12 sequências não corresponderam a nenhum dos Grupos previamente descritos. A partir do alinhamento realizado (**Figura 5**), observa-se que essas 12 sequências correspondem a dois novos Grupos, com assinaturas aminoacídicas específicas. Seguindo a classificação adotada na literatura, os dois novos Grupos foram denominados de Grupo F (7 sequências) e Grupo G (5 sequências), respectivamente. Além das assinaturas específicas de cada Grupo de ALF, que permitiu a separação e classificação das sequências, foi possível identificar uma assinatura consenso presente em todas as sequências de ALFs de camarões peneídeos. Essa sequência consenso é composta pelos dois resíduos conservados de cisteína, que delimitam uma região com 20 resíduos aminoacídicos envolvidos na atividade antimicrobiana da molécula, assim como por dois resíduos de prolina, um de glicina e um de alanina dispostos ao longo da sequência (**Figura 5**).

Figura 5 – Alinhamento das seqüências aminoácídicas dos peptídeos maduros de ALFs de camarões penéides.



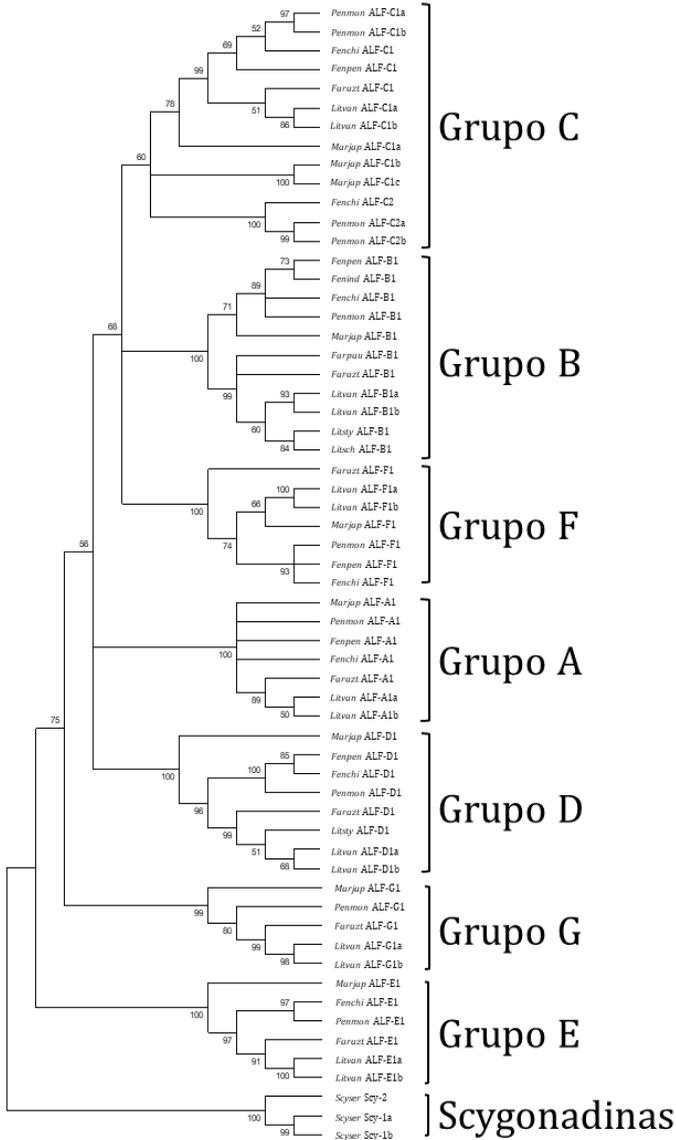
Os resíduos aminoácídicos conservados em todos os Grupos de ALFs estão destacados em preto enquanto que aqueles que são característicos de cada Grupo (ALF-A a ALF-G) estão destacados em cinza. A régua acima das seqüências indica as posições dos resíduos aminoácídicos. Os pontos (.) indicam resíduos idênticos em relação à primeira seqüência de cada Grupo e os hifens (-) indicam *gaps*.

A fim de compreender a relação entre os diferentes Grupos de ALFs, uma reconstrução filogenética pelo método de *Neighbor Joining* (**Figura 6**) foi realizada. Para essa análise, foram utilizadas as sequências aminoacídicas dos peptídeos maduros dos ALFs recuperados, assim como sequências do peptídeo maduro de Scygonadinas como grupo externo (**Apêndice 2**). As Scygonadinas compõem uma família de AMPs encontrados na espécie de caranguejo *Scylla serrata*, que possuem dois resíduos conservados de cisteínas de maneira similar aos ALFs. A partir da reconstrução filogenética realizada, fica evidente a separação de ALFs em pelo menos sete clados distintos (**Figura 6**), confirmando o observado no alinhamento. Membros dos sete clados de ALFs foram identificados em pelo menos quatro espécies diferentes (*L. vannamei*, *F. aztecus*, *P. monodon* e *M. japonicus*) confirmando, assim, que pelo menos sete Grupos distintos de ALFs são encontrados em camarões peneídeos. A partir da reconstrução filogenética realizada, observa-se que alguns Grupos são mais relacionados entre si (Grupos B, C e F), enquanto que o Grupo E mostrou-se o mais distante dos outros ALFs.

Além dos novos Grupos, foram identificadas e caracterizadas sequências pertencentes ao Grupo E (até o momento exclusivo de *M. japonicus*) em *L. vannamei*, *F. aztecus*, *F. chinensis* e *P. monodon*, confirmando a ampla ocorrência desse Grupo em camarões peneídeos. No entanto, desconsiderou-se a sequência *MjALF-E1* (JIANG *et al.*, 2015) das análises, assim como as homólogas identificadas em *P. monodon* (GenBank:GEME01078054) e *L. vannamei* (GenBank:GETZ01065938), dado que essas não apresentam a assinatura ALF conservada em todos os outros Grupos (**Figura 5**). Além da remoção da sequência *MjALF-E1*, outras sequências de *M. japonicus* classificadas por JIANG *et al.*, (2015) foram reclassificadas: *MjALF-D1* foi reclassificada no Grupo F (*Marjap* ALF-F1) e *MjALF-A2* foi reclassificada no Grupo G (*Marjap* ALF-G1).

Por fim, para contribuir com o entendimento e sistematização da diversidade de ALFs encontrada em camarões peneídeos, todas as sequências utilizadas neste trabalho (**Apêndice 1**) foram renomeadas de acordo com o proposto por ROSA *et al.*, (2013). As sequências foram nomeadas com as seis primeiras letras, em itálico, da espécie de camarão peneídeo (três letras para gênero e três para espécie), seguido da abreviação ALF, seguido por um hífen e o número de identificação dentro do Grupo de classificação (exemplo: *Litvan* ALF-A1, representando uma sequência de ALF pertencente ao Grupo A da espécie *Litopenaeus vannamei*).

Figura 6 – Árvore filogenética construída a partir do alinhamento dos peptídeos maduros de ALFs de camarões penéideos e Scygonadinas.



A árvore foi construída utilizando o método de *Neighbor Joining* (1.000 replicatas) no programa MEGA 7.0. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós da árvore. Ramos com suporte abaixo de 50% foram condensados.

5.2. Caracterização molecular dos ALFs de camarões peneídeos

Além da identificação e classificação de novas sequências, a partir das análises *in silico*, buscou-se caracterizar molecularmente cada sequência recuperada e cada Grupo de ALF (**Apêndice 1**). O número de resíduos aminoacídicos, a massa molecular (MM), o *pI* do peptídeo maduro e da região entre cisteínas dos Grupos de ALFs em camarões peneídeos estão apresentados no **Quadro 5**.

Quadro 5 – Caracterização molecular dos ALFs de camarões peneídeos.

ALF	Pep sinal	Pep maduro	MM do pep maduro (kDa)	<i>pI</i> do pep maduro	<i>pI</i> da região entre cisteínas
Grupo A	22 aa	98 aa	11,43-11,52	5,88-8,06	9,39-9,84
Grupo B	25 aa	97-98 aa	11,04-11,23	9,64-10,29	9,70-10,04
Grupo C	24-25 aa	98 aa	11,00-11,30	5,27-9,77	8,03-10,32
Grupo D	25-26 aa	98 aa	10,74-10,92	5,23-6,10	4,03-6,05
Grupo E	24-26 aa	99-101aa	11,06-11,40	5,33-6,12	9,19-9,31
Grupo F	25 aa	98 aa	11,06-11,32	8,62-9,47	8,82-10,31
Grupo G	27-28 aa	102-105 aa	11,55-12,23	5,02-6,13	9,90-10,47

aa: resíduos aminoacídicos. MM: massa molecular. *pI*: ponto isoelétrico teórico.

Os ALFs do Grupo A apresentam um peptídeo sinal de 22 resíduos aminoacídicos, seguido de um peptídeo maduro levemente aniônico de 98 resíduos aminoacídicos (MM: 11,43 a 11,52 kDa). O *pI* teórico da região entre cisteínas é bastante conservada nas diferentes espécies e possui caráter catiônico (*pI* = 9,39 ou 9,84).

Os ALFs do Grupo B apresentam um peptídeo sinal de 25 resíduos aminoacídicos seguido de um peptídeo maduro de 97 ou 98 resíduos aminoacídicos (MM: 11,04 a 11,23 kDa). Esse Grupo de ALFs apresenta tanto o peptídeo maduro (*pI* variando entre 9,64 e 10,29) quanto a região entre cisteínas (*pI* variando entre 9,7 e 10,04) de caráter altamente catiônico.

Os ALFs do Grupo C apresentam um peptídeo sinal de 24 ou 25 resíduos aminoacídicos seguido de um peptídeo maduro aniônico ou catiônico de 98 resíduos aminoacídicos (MM: 11,00 e 11,30 kDa). A região entre cisteínas nas diferentes espécies possui caráter catiônico (*pI* ente 8,03 e 10,32). Curiosamente, os ALFs do Grupo C se mostraram divididos em pelo menos dois sub-Grupos (sub-Grupos C1 e C2). Sequências pertencentes ao sub-Grupo C1 foram amplamente encontradas nas espécies de camarões peneídeos e apresentam caráter catiônico. Enquanto que sequências do sub-Grupo C2 foram encontradas apenas nas espécies *P. monodon* e *F. chinensis*, sendo *Fenchi* ALF-C2 a única com caráter aniônico (**Apêndice 1**).

Os ALFs do Grupo D apresentam um peptídeo sinal de 25 ou 26 resíduos aminoácídicos seguido de um peptídeo maduro de 98 resíduos aminoácídicos (MM: 10,74 a 10,92 kDa). As sequências pertencentes a esse Grupo apresentam tanto o peptídeo maduro (pI entre 5,23 e 6,10) quanto a região entre cisteínas (pI entre 4,03 e 6,05) de caráter aniônico.

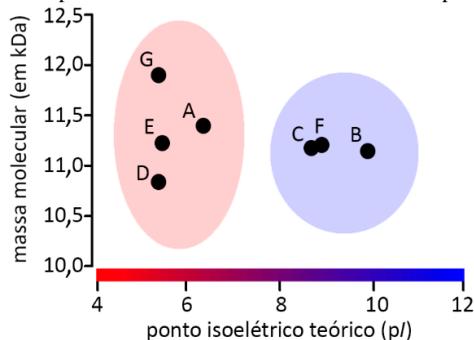
Os ALFs do Grupo E apresentam um peptídeo sinal de 24 a 26 resíduos aminoácídicos seguidos de um peptídeo maduro de 99 a 101 resíduos aminoácídicos (MM: 11,06 a 11,40 kDa). Os ALFs desse grupo apresentam um peptídeo maduro de caráter aniônico (pI entre 5,33 e 6,12), porém diferentemente do Grupo D, a região entre cisteínas apresenta caráter catiônico (pI entre 9,19 e 9,31).

Os ALFs do Grupo F apresentam um peptídeo sinal de 25 resíduos aminoácídicos seguido por um peptídeo maduro de 98 resíduos aminoácídicos (MM: 11,06 a 11,32 kDa). Assim como o Grupo B, tanto o peptídeo maduro desse grupo (pI entre 8,62 e 9,47) quanto a região entre cisteínas (pI entre 8,82 e 10,31) apresentam caráter catiônico.

Finalmente, os ALFs do Grupo G apresentam um peptídeo sinal de 27 a 28 resíduos aminoácídicos seguido de um peptídeo maduro de 102 a 105 resíduos aminoácídicos (MM: 11,55 a 12,23 kDa). Assim como o Grupo E, o peptídeo maduro de ALFs do Grupo G apresentam caráter aniônico (pI entre 5,02 e 6,13) e região entre cisteínas de caráter catiônico (pI entre 9,90 e 10,47).

A relação entre a MM e o pI dos pepetídeos maduros (**Figura 7**) evidencia a diferença observada nas características bioquímicas dos diferentes Grupos de ALFs encontrados em camarões peneídeos.

Figura 7 – Relação entre a massa molecular e o ponto isoelétrico teórico dos peptídeos maduros dos diferentes Grupos de ALFs encontrados em camarões peneídeos.

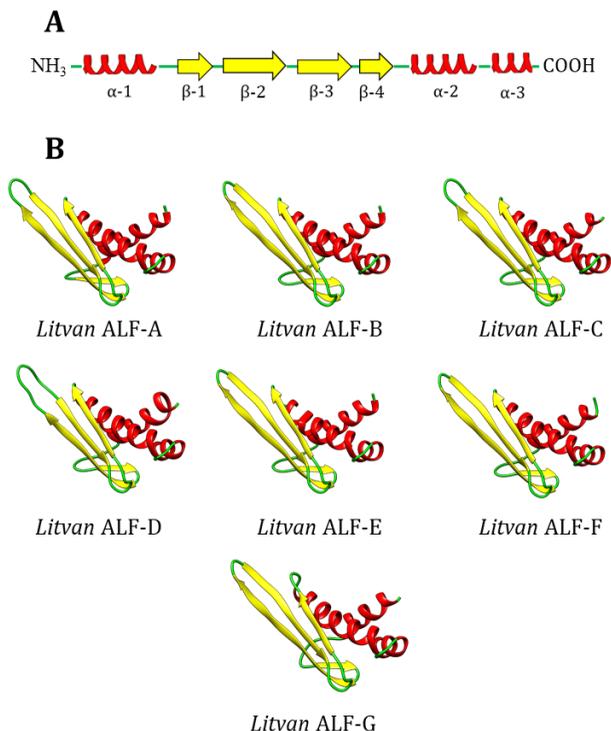


As letras referem-se aos respectivos Grupos de ALF. Em azul estão apontados os grupos com peptídeos maduros catiônicos e em vermelho os grupos com peptídeos maduros aniônicos.

5.3. Caracterização estrutural dos ALFs de *L. vannamei*

A fim de avaliar as implicações da diversidade observada nas sequências de ALFs, escolheu-se a espécie *L. vannamei* como modelo, dado que essa espécie apresenta sequências representativas de todos os Grupos identificados e devido a sua grande relevância no cenário da carcinicultura mundial. Até o momento apenas duas estruturas de ALFs foram resolvidas, a do L-ALF do limulídeo *L. polyphemus* por cristalografia (HOESS *et al.*, 1993) e do ALFPm3 (*Penmon* ALF-B1) do camarão *P. monodon* por RMN (YANG *et al.*, 2009) (**Figura 3**). A fim de caracterizar a estrutura tridimensional (3D) dos ALFs de *L. vannamei*, assim como avaliar o efeito da diversidade aminoacídica na estrutura do peptídeo, modelos da estrutura 3D foram construídos com a ferramenta SWISS-MODEL. Para construção dos modelos, sequências representativas de cada Grupo foram alinhadas com a sequência *Penmon* ALF-B1 (PDB: 2JOB) e modelos da estrutura 3D dos sete Grupos de ALFs em *L. vannamei* foram gerados (**Figura 8**). Os sete Grupos de ALFs apresentaram uma estrutura 3D conservada, composta por 3 α -hélices e 4 folhas- β . Essa mesma estrutura foi observada por HOESS *et al.*, (1993) e YANG *et al.*, (2009), confirmando que, apesar das diferenças observadas na estrutura aminoacídica primária, a estrutura 3D se mantém conservada nessa família de AMPs.

A fim de verificar se os resíduos envolvidos na ligação a LPS (YANG *et al.*, 2009), são conservados nos diferentes Grupos de ALFs de *L. vannamei*, sequências representativas de cada grupo foram alinhadas com *Penmon* ALF-B1. A partir do alinhamento de sequências (**Figura 9**), observou-se que esses resíduos não são conservados em todos os Grupos de ALFs. A sequência *Litvan* ALF-B1, pertencente ao Grupo B assim como *Penmon* ALF-B1, apresenta o maior número de resíduos conservados (5), enquanto que as sequências dos outros Grupos apresentam um número variado (Grupo A = 4, Grupo G = 3, Grupos C e F = 2 e os Grupos D e E = 1; **Figura 10**).

Figura 8 – Modelos estruturais dos ALFs do camarão *Litopenaeus vannamei*

A. Esquema da estrutura secundária dos ALFs de *L. vannamei* com 3 α -hélices (vermelho) e 4 folhas- β (amarelo). **B.** Modelos tridimensionais (3D) de sequências representativas dos sete Grupos de ALFs de *L. vannamei*.

Figura 9 – Alinhamento do peptídeo maduro de diferentes ALFs do camarão *Litopenaeus vannamei* com Penmon ALF-B1 do camarão *Penaeus monodon*.

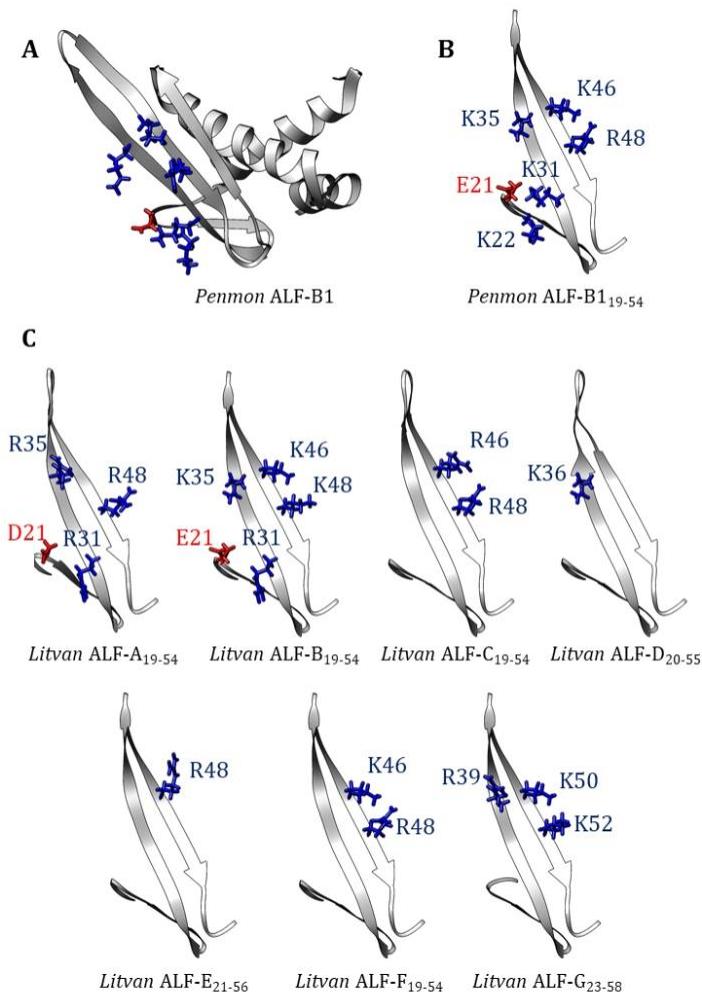
```

Penmon ALF-B1  ---QGEAVAAVAASKIVGLWRNEKTELLGHGKPTVKPKYLRKFQVYKGRNMPGWTAIRGEAS-TRSQSGVAGRTAKDFVRKAFQKGLISQEQEANQWLS--
Litvan ALF-A1  ---QGVDDLPSLVQRIVGLWHSDEVEFMGRSQRYSQRSPFYRWELFYNGRMVPGWAPFTGRSR-TRSPSGAVEHATRDFVQKALQSNLITEDDARLWLEH--
Litvan ALF-B1  ---QGVQAVAAVAASKIVGLWRNEKTELLGHGKRPFTVKPKYLRKQLNYKGRMMPGWTAIRGEAR-TRSHSGVAGRTARDVEKAFKFDGLISEQAKRWLN--
Litvan ALF-C1  ---SGWELVPPAIANKLITGLWESGELLELLGHVQNFNSVTPKFKWQLYFRGRMMPGWTAIRGEAR-TRSRSGVGVGRRTQDFVRKAFAGLITSESAQVWLN--
Litvan ALF-D1  ---FSLKGLVPPVKDQVSDLWRTGDDLVGRSSTYNVMPDIDGFELEYFGSVTPGWTAIRGEAN-TRSRSGVNVAAVKDITQKALKAGLITSESAQVWLN--
Litvan ALF-E1  ---RPQLGDLVLSVVEFLKNAVKTSELTLLNLYVWNSPYLKKFEVHYRADVMPGWTIIVGRGSDHTNPTNSELDAIKDFVRKAVIKGIMTDEAAEYLV---
Litvan ALF-F1  ---QVWETLIPLITQVVGWLMKTGEREMFGEHRYEYFVTPKVKSEELYFKGRMTPTLNVRGREAL-TRSRSGVEAKTVEDVVRKVKVEKGVITEEEAKANLKK--
Litvan ALF-G1  QEMEDQDNVYADIFNSINSLVKGDETELLGHVSYSTRPFLWRLLKFKKRVKMPGWTIVYGSASESSVNSIQNAIINFTQVAYQEGVITEDAKPWLQGNH

```

A região destacada em cinza escuro se refere à região do peptídeo onde são encontrados os resíduos aminoácídicos envolvidos na ligação ao LPS, indicados pelas setas (▼) (YANG *et al.*, 2009). Os dois resíduos de cisteína estão destacados em preto. Em azul estão destacados os resíduos aminoácídicos carregados positivamente (R e K) e em vermelho estão destacados os resíduos aminoácídicos carregados negativamente (D e E). Os hifens (-) indicam *gaps*.

Figura 10 – Representação dos resíduos aminoacídicos envolvidos na ligação ao LPS nos diferentes Grupos de ALF.



A. Estrutura tridimensional de *Penmon* ALF-B1 (PDB 2JOB), indicando a cadeia lateral dos resíduos aminoacídicos carregados envolvidos na ligação ao LPS. **B.** Destaque da região de *Penmon* ALF-B1 onde estão localizados os resíduos aminoacídicos envolvidos na ligação a LPS. **C.** Destaque dos ALFs de *L. vannamei* (Grupos A-G) apontando os resíduos carregados conservados com *Penmon* ALF-B1 potencialmente envolvidos na ligação ao LPS. Em azul estão destacados os resíduos aminoacídicos carregados positivamente (R e K) e em vermelho estão destacados os resíduos aminoacídicos carregados negativamente (D e E).

5.4. Distribuição da expressão gênica de ALFs em diferentes tecidos

A fim de verificar os diferentes tecidos envolvidos na expressão de ALFs, a distribuição da expressão gênica foi verificada por RT-PCR em oito diferentes tecidos/órgãos de camarões *L. vannamei* (estômago, hepatopâncreas, intestino médio, intestino posterior, hemócitos, músculo, brânquias e cordão nervoso). Em todos os tecidos analisados, a amplificação de transcritos de β -actina mostrou-se estável (**Figura 11**), confirmando a integridade do cDNA utilizado em cada amostra e permitindo as comparações entre os diferentes tecidos. O perfil de expressão de ALFs se mostrou diverso nos tecidos analisados (**Figura 11**), porém todos os genes se mostraram expressos em hemócitos circulantes. ALFs dos Grupos A e B foram detectados em estômago, intestino médio, hemócitos, brânquias e cordão nervoso. ALFs do Grupo C foram detectados em intestino médio, hemócitos e brânquias. ALFs do Grupo D foram detectados exclusivamente em hemócitos. ALFs dos Grupos E e G foram detectados em hemócitos e brânquias. ALFs do Grupo F foram detectados em estômago, intestino médio, hemócitos e brânquias.

5.5. Perfil de expressão gênica frente a infecções experimentais

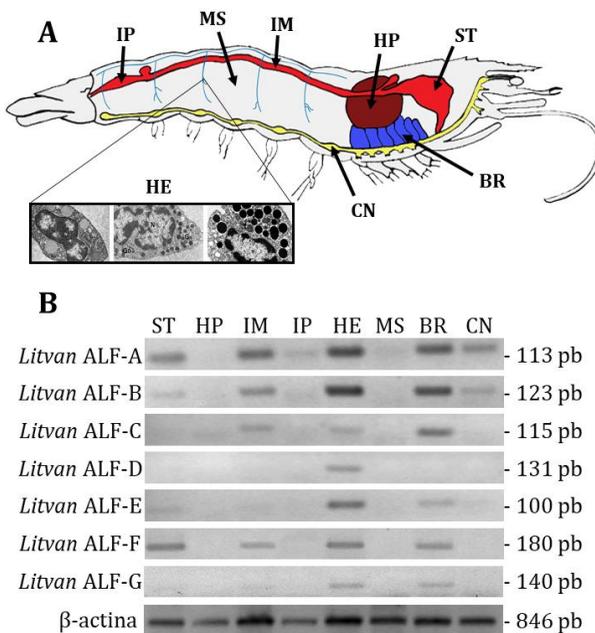
A fim avaliar o envolvimento dos diferentes Grupos de ALFs frente a infecções, os níveis de transcritos de ALFs foram quantificados em hemócitos e intestino médio de animais infectados experimentalmente com a bactéria Gram-negativa *V. harveyi* ATCC 14126 ou com o WSSV. Optou-se por avaliar a expressão de ALFs em hemócitos dado que todos os ALFs se mostraram expressos nessas células (**Figura 11**) e em intestino médio que representa uma das principais vias de entrada desses microrganismos em infecções naturais. De maneira geral, o perfil de expressão dos ALFs se mostrou diverso entre as replicatas biológicas de uma mesma condição experimental (**Figura 12**). Curiosamente, enquanto que em hemócitos a expressão foi modulada pela injúria causada pela injeção, em intestino médio a expressão de ALFs dos Grupos A e C foi induzida especificamente pela infecção bacteriana.

Em hemócitos (**Figura 12**), os níveis de transcritos de ALFs dos Grupos A, D e E não foram modulados frente às infecções experimentais, enquanto que de ALFs dos Grupos B, C, F e G foram induzidos pela injúria tecidual. Em relação à infecção por *V. harveyi*, os níveis de transcritos de ALFs dos Grupos B e F foram maiores (5,9 e 9,3 vezes, respectivamente) em animais experimentalmente infectados com *V. harveyi* em comparação à condição “*Naïve*” ($P < 0,05$), porém não foi

observada diferença estatística em relação à condição “Salina”. Em relação à infecção por WSSV, os níveis de transcritos de ALFs dos Grupos B, C, F e G foram induzidos pela injeção do controle de infecção viral (tecido macerado livre de WSSV) e não pela infecção com WSSV.

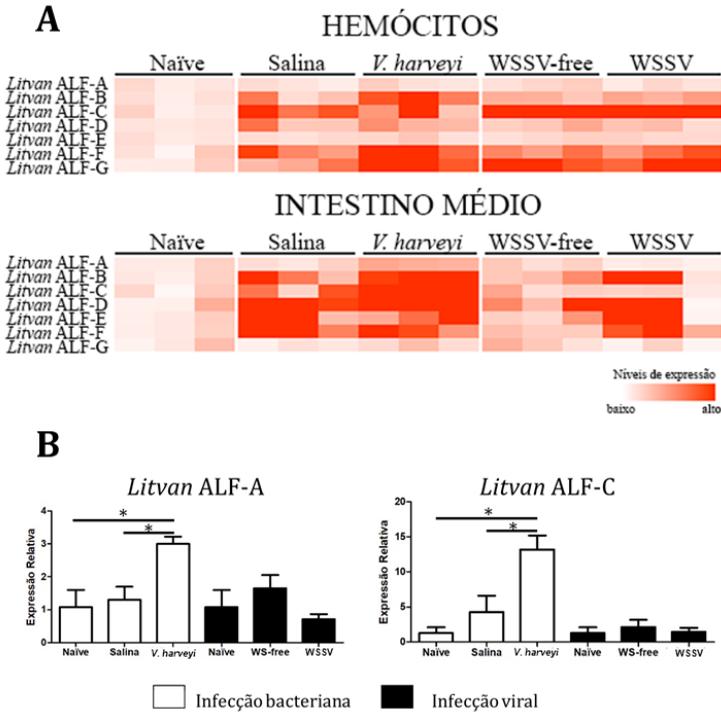
Em intestino médio (**Figura 12**), os níveis de transcritos de ALFs dos Grupos A e C foram induzidos especificamente pela infecção com a bactéria *V. harveyi*. Os níveis de transcritos de ALFs dos Grupos A e C foram 2,3 e 3,0 vezes maiores, respectivamente, em camarões infectados por *V. harveyi* em relação à condição “Salina” ($P < 0,05$) (**Figura 12 B**). A indução dos níveis de transcritos de ALFs dos demais Grupos não foi considerada significativa em nenhuma das infecções experimentais.

Figura 11 – Distribuição da expressão gênica dos ALFs de *Litopenaeus vannamei*.



A. Esquema anatômico de um camarão peneídeo apontando os órgão/tecidos coletados para as análises: três porções do intestino (ST: estômago, IM: intestino médio e IP: intestino posterior) em vermelho, HP: hepatopâncreas em vermelho escuro, BR: brânquias em azul escuro, sistema circulatório (HE: hemócitos) em azul claro e CN: cordão nervoso em amarelo [adaptado de FALCHETTI, (2016); GARGIONI; BARRACCO, (1998)]. **B.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação de transcritos dos sete Grupos de ALFs e β -actina (controle). pb: pares de base.

Figura 12 – Níveis de transcritos de ALFs (Grupos A a G) em hemócitos e intestino médio após 48 h de infecções experimentais.



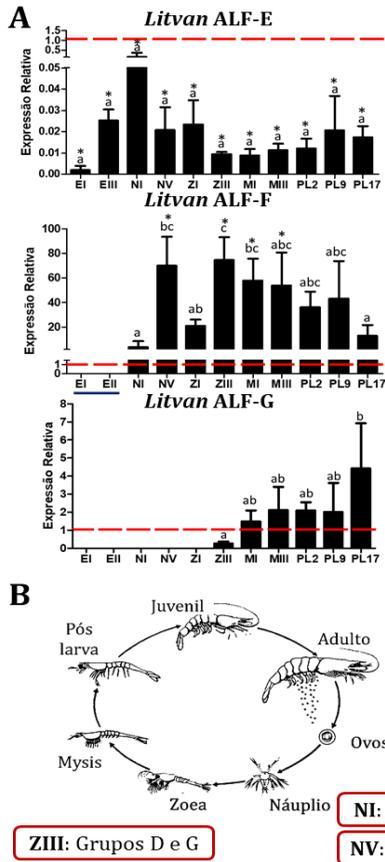
A. *Heatmap* de expressão relativa de ALFs em hemócitos e intestino médio. Cada retângulo da figura acima corresponde ao nível de expressão gênica em cada *pool* de animais nas diferentes condições experimentais, onde a intensidade da cor (do branco ao vermelho) indica a magnitude de expressão, segundo a escala de cor presente na parte inferior da figura. **B.** Gráficos de expressão relativa de ALFs dos Grupos A e C em intestino médio. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de triplicatas biológicas. Diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$) estão apontadas com asterisco (*).

5.6. Perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento

Os níveis de transcritos de ALFs foram quantificados por RT-qPCR ao longo do desenvolvimento de *L. vannamei*. QUISPE *et al.*, (2016) quantificaram os níveis de transcritos de ALFs dos Grupos A a D em 11 estágios do desenvolvimento: ovos fertilizados de 0-4 h (EI) e de 7-11 h pós-desova (EII), Náuplios I e V (NI e NV), Protozoas I e III (ZI e ZIII), Misis I e III (MI e MIII) e Pós-larvas com idade de 2, 9 e 17 dias (PL2, PL9 e PL17). De maneira similar, neste trabalho, quantificou-se os níveis de transcritos de ALFs dos Grupos E, F e G nos mesmos estágios (**Figura 13**). Para as análises de expressão relativa, utilizou-se os níveis de transcritos em hemócitos de animais juvenis (células que expressam todos os Grupos de ALFs) como condição calibradora. Considerou-se como “não detectável” os produtos gênicos que não formaram uma curva de dissociação, enquanto que aqueles que formaram uma curva de dissociação, mas apresentaram valores de C_q acima do limite de quantificação foram considerados “não quantificáveis”.

Transcritos de ALFs do Grupo E foram detectados em todos os estágios de desenvolvimento, especialmente em Náuplios I (NI). Os níveis de transcritos desses ALFs em todos os estágios analisados foram significativamente menores do que os encontrados em hemócitos de camarões juvenis ($P < 0,05$). Transcritos de ALFs do Grupo F foram detectados em todos os estágios de desenvolvimento, contudo, sua expressão foi quantificável apenas a partir do estágio de Náuplios I (NI). Os níveis de transcritos de ALFs do Grupo F foram significativamente maiores nos estágios larvais (68 vezes em NV; 73 vezes em ZIII; 57 vezes em MI; e 53 vezes em MIII) do que em hemócitos de camarões juvenis ($P < 0,05$). Transcritos de ALFs do Grupo G foram detectados e quantificáveis apenas a partir do estágio de Protozoa III (ZIII) e, mesmo com níveis de transcritos 4 vezes maiores nos estágios pós larvais (PL17) que em hemócitos de camarões juvenis, esse aumento não foi considerado significativo ($P > 0,05$).

Figura 13 – Perfil transcripcional de ALFs dos Grupos E, F e G ao longo do desenvolvimento do camarão *Litopenaeus vannamei*.



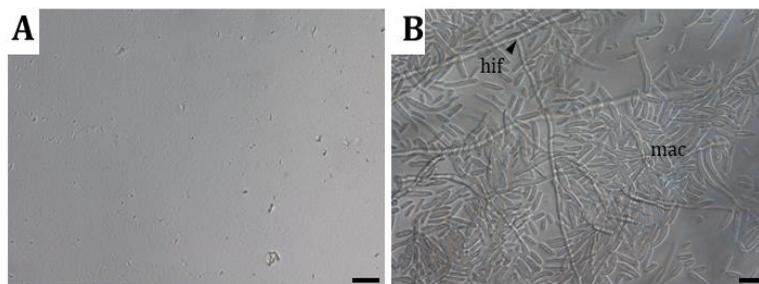
A. Gráficos de expressão relativa dos ALFs dos Grupos E, F e G ao longo do desenvolvimento do camarão *L. vannamei*. Letras diferentes apontam diferenças estatísticas entre os estágios de desenvolvimento enquanto que os asteriscos (*) apontam diferenças estatísticas entre os estágios de desenvolvimento e os hemócitos de animais juvenis. **EI**: ovos fertilizados de 0-4 h pós-desova. **EII**: ovos fertilizados de 7-11 h pós-desova. **NI**: Náuplios I. **NV**: Náuplios V. **ZI**: Protozoa I. **ZIII**: Protozoa III. **MI**: Misis I. **MIII**: Misis III. **PL2**: Pós-larvas de 2 dias. **PL9**: Pós-larvas de 9 dias. **PL17**: Pós-larvas de 17 dias. A linha vermelha pontilhada representa o nível de expressão em hemócitos de animais juvenis e a linha azul representa estágios em que os transcritos foram detectados, porém não foram quantificáveis. **B.** Esquema ilustrativo das fases do desenvolvimento [adaptado de LEE; WICKINS, (2003)] apontando o estágio a partir do qual é possível a detecção de cada Grupo de ALF em *L. vannamei*.

5.7. Espectro de atividade antimicrobiana dos novos ALFs de *L. vannamei*

Peptídeos derivados do Grupo E (primeiro relato desse Grupo na espécie *L. vannamei*) e dos dois novos Grupos descritos em camarões peneídeos (Grupo F e Grupo G) foram sintetizados a fim de avaliar sua atividade antimicrobiana. Testes de concentração inibitória mínima (MIC; **Quadro 6** foram realizados contra 6 bactérias Gram-positivas, 7 bactérias Gram-negativas, contra a levedura *C. albicans* e contra o fungo filamentososo *F. oxysporum*. Para os testes, foram escolhidos microrganismos de interesse médico e veterinário, além de patógenos de camarões (bactérias do gênero *Vibrio* e o fungo *F. oxysporum*).

Peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas de *Litvan* ALF-G (*Litvan* ALF-G₃₄₋₅₅) foram capazes de inibir o crescimento de todas as bactérias Gram-positivas testadas (MIC variando entre 5-40 μM) e dos patógenos de camarões *V. nigripulchritudo* (20-40 μM) e *F. oxysporum* (5-10 μM ; **Figura 14**). O efeito bactericida (MBC) de *Litvan* ALF-G₃₄₋₅₅ foi observado para as bactérias Gram-positivas *M. maritypicum* (10-20 μM), *B. stationis* (20-40 μM) e *B. cereus* (20-40 μM). *Litvan* ALF-E₃₂₋₅₃ inibiu o crescimento das bactérias Gram-positivas marinhas *M. maritypicum* e *C. stationis* (20-40 μM) e do fungo *F. oxysporum* (10-20 μM ; **Figura 14**). Diferente de *Litvan* ALF-G₃₄₋₅₅, não foi observado efeito bactericida para *Litvan* ALF-E₃₂₋₅₃. De maneira interessante, peptídeos sintéticos derivados do *Litvan* ALF-F (*Litvan* ALF-F₃₀₋₅₁) não apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.

Figura 14 – Micrografias representativas dos testes de inibição do crescimento do fungo filamentososo *Fusarium oxysporum*.



A. Controle negativo de crescimento (sem crescimento do fungo). Escala = 50 μm . **B.** Controle positivo de crescimento com presença de hifas (hif; ▼) e macroconídeos (mac). Escala = 20 μm .

Quadro 6 – Espectro de atividade antimicrobiana de peptídeos sintéticos derivados dos ALFs dos Grupos E, Fe G de *Litopenaeus vannamei*.

Microrganismos	Litvan ALF-E ₃₂₋₅₃		Litvan ALF-F ₃₀₋₅₁		Litvan ALF-G ₃₄₋₅₅	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Bactérias Gram-positivas						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	>40	>40	>40	>40	10-20	>40
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>40	>40	>40	>40	10-20	>40
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	>40	>40	>40	>40	20-40	20-40
<i>Micrococcus luteus</i> CIP 5345	>40	>40	>40	>40	10-20	>40
<i>Microbacterium maritypicum</i> CIP 105733	20-40	>40	>40	>40	5-10	10-20
<i>Brevibacterium stationis</i> CIP 101282	20-40	>40	>40	>40	5-10	20-40
Bactérias Gram-negativas						
<i>Escherichia coli</i> SBS363	>40	>40	>40	>40	>40	>40
<i>Pseudomonas aureginosa</i> ATCC 9027	>40	>40	>40	>40	>40	>40
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 33658	>40	>40	>40	>40	>40	>40
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	>40	>40	>40	>40	>40	>40
<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749	>40	>40	>40	>40	>40	>40
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264	>40	>40	>40	>40	>40	>40
<i>Vibrio nigripulchritudo</i> CIP103195	>40	>40	>40	>40	20-40	>40
Fungos						
<i>Candida albicans</i> MDM8	>40	>40	>40	>40	>40	>40
<i>Fusarium oxysporum</i>	10-20	nd	>40	>40	5-10	nd

Os valores de MIC (concentração inibitória mínima) e MBC (concentração bactericida mínima) estão expressos em μM . O intervalo representa a maior concentração de peptídeo em que houve crescimento microbiano e a menor concentração de peptídeo capaz de inibir 100% do crescimento microbiano. nd: não determinado.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) compreendem uma família de peptídeos antimicrobianos (AMPs) diversa em termos de sequência, propriedades bioquímicas, perfil de expressão gênica e atividade antimicrobiana. Após a sistematização da diversidade encontrada, utilizou-se a espécie *L. vannamei* como modelo para o estudo comparativo do perfil transcricional e da atividade antimicrobiana dos diferentes Grupos de ALFs de camarões peneídeos. Essa família de AMPs parece restrita a quelicerados marinhos da família Limulidae (*T. tridentatus*, *L. polyphemus* e *Carcinoscorpius rotundicauda*) e a crustáceos da classe Malacostraca (decápodes, isópodes, anfípodes). No entanto, enquanto que os quelicerados marinhos apresentam apenas uma forma de ALF (TANAKA *et al.*, 1982), os ALFs de camarões peneídeos compõem uma família multigênica altamente diversa.

Neste trabalho foi demonstrado que a diversidade de ALFs encontrada em camarões peneídeos é maior do que o descrito na literatura. Até o momento, cinco Grupos de ALFs (Grupos A-E) haviam sido caracterizados em camarões peneídeos com base na sua estrutura gênica, composição aminoacídica e características bioquímicas (JIANG *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2013; PONPRATEEP *et al.*, 2012; THARNTADA *et al.*, 2008). A partir do alinhamento dos peptídeos maduros recuperados e da reconstrução filogenética realizada, dois novos Grupos de ALFs, Grupo F e Grupo G, foram caracterizados com assinaturas aminoacídicas específicas. Também foi demonstrado que os ALFs de camarões peneídeos apresentam características bioquímicas distintas, sendo uma família composta tanto por peptídeos catiônicos (Grupos B, C e F) quanto por peptídeos aniônicos (Grupos A, D, E e G). Essa diversidade observada em nível de sequência está diretamente relacionada à divergência funcional dos Grupos de ALFs e ao amplo espectro de atividade antimicrobiana observado nessa família de AMPs.

Membros dos sete Grupos de ALFs foram identificados em pelo menos quatro espécies de camarões peneídeos: *L. vannamei*, *F. aztecus*, *P. monodon* e *M. japonicus*. Levando em consideração a distância evolutiva entre as espécies *L. vannamei* e *M. japonicus*, esses resultados indicam que os Grupos de ALFs são parálogos e evoluíram a partir de eventos de duplicação gênica em um ancestral comum de camarões peneídeos. Apesar de a reconstrução filogenética deste trabalho ter sido realizada apenas com sequências de peptídeos maduros, foi demonstrado em estudos anteriores que os Grupos A, B, C e F são codificados por

genes diferentes (LIU *et al.*, 2014; PONPRATEEP *et al.*, 2012), indicando que a diversidade encontrada está relacionada a diferentes genes e não apenas a diferentes alelos. No entanto, ainda são poucos os estudos acerca da história evolutiva de ALFs em crustáceos (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016; REN *et al.*, 2012). Dessa maneira, a fim de compreender a relação entre os diferentes Grupos de ALFs e verificar se a diversidade observada em camarões peneídeos é observada também em outros táxons de crustáceos, se fazem necessários novos estudos filogenéticos incluindo sequências de outros táxons de crustáceos e limulídeos.

Foi demonstrado que os ALFs de camarões peneídeos são classificados em, pelo menos, sete Grupos distintos, sendo assim, a família mais diversa de AMPs encontrada em camarões peneídeos. É proposto que a diversidade de sequências em uma família de AMP seja resultado da seleção de diferentes isoformas ampliando o seu espectro de atividade antimicrobiana ou adquirindo novas funções imunológicas (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). Uma das hipóteses levantadas é que a diversidade estaria associada à relação patógeno-hospedeiro sob uma visão de coevolução adaptada da teoria da Rainha Vermelha (*Red Queen hypothesis* - van VALEN, 1974) (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). De maneira geral, características que permitam os patógenos escaparem das respostas de defesa do hospedeiro sofrem forte pressão evolutiva, enquanto que características do sistema imune do hospedeiro que aumentem a barreira contra patógenos também sofrem constante pressão evolutiva. Essa teoria prevê que, devido a essa “corrida armada” entre patógenos e hospedeiros, a diversidade e polimorfismos de moléculas essenciais à essa interação são induzidos. Sendo assim, genes envolvidos no sistema imune, como os ALFs, podem apresentar um grande nível de diversidade genética (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016).

Apesar da diversidade observada em nível de estrutura aminoacídica primária, a estrutura tridimensional (3D) dos ALFs se mantém conservada nos diferentes Grupos. Análises moleculares da diversidade de ALFs em crustáceos apontam que a seleção opera em sítios específicos de aminoácidos e não na sequência completa do peptídeo (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). Regiões essenciais para o funcionamento do peptídeo encontram-se sob influência de seleção negativa, dado que pequenas alterações aminoacídicas podem comprometer a sua atividade. Em contrapartida, alguns códons estão sob influência de seleção positiva, dado que pequenas mudanças na estrutura aminoacídica primária podem aumentar o potencial antimicrobiano do

peptídeo (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016; REN *et al.*, 2012). Dessa maneira, ao passo que a estrutura 3D de ALFs é conservada, observou-se que resíduos envolvidos na ligação a LPS não são conservados em todos os Grupos de ALFs. Estudos com ALFs de crustáceos demonstraram que além de afinidade com o lipídeo A do LPS (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008), os ALFs também apresentam afinidade com outros componentes microbianos como o ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008) e β -glicanas de fungos (SUN *et al.*, 2011). Dado que a alta afinidade desses peptídeos a componentes microbianos é tida como essencial para a sua atividade antimicrobiana (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016), é possível que a diversidade encontrada nas sequências esteja associada à afinidade de ligação a diferentes componentes microbianos, ampliando o espectro de atividade dessa família de AMPs. Contudo, estudos comparativos entre a afinidade de ligação de ALFs de cada Grupo são necessários para confirmar essa hipótese.

Além da diversidade observada em nível de sequência, foi demonstrado que os ALFs de diferentes Grupos apresentam espectros de atividade antimicrobiana distintos. A região entre cisteínas é considerada como a responsável pela atividade biológica dos ALFs, dado que peptídeos derivados dessa região apresentam afinidade de ligação e atividade antimicrobiana similares ao peptídeo maduro completo (JIANG *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2013; SOMBOONWIWAT *et al.*, 2005). Dessa maneira, a fim de avaliar a diversidade funcional dos ALFs, peptídeos derivados da região entre cisteínas do Grupo E (primeiro relato desse grupo na espécie *L. vannamei*) e dos dois novos Grupos descritos em camarões peneídeos (Grupo F e Grupo G) foram sintetizados. Comparando os resultados obtidos nos testes de atividade antimicrobiana com a literatura, observa-se que a diversidade funcional dos ALFs está relacionada aos Grupos em que são classificados e não às espécies em que são encontrados. Enquanto alguns Grupos apresentam amplo espectro de atividade (Grupos B, C e G) em diferentes espécies de camarões peneídeos, outros apresentam atividade antimicrobiana restrita (Grupo E) ou até mesmo baixa atividade antimicrobiana (Grupos A, D e F) (JIANG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2013).

A atividade antimicrobiana de ALFs está vinculada principalmente a alta afinidade desses peptídeos a componentes microbianos (LPS, LTA e β -glicanas) (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). Ao comparar ALFs dos Grupos D e E, observa-se que, apesar de ambos os peptídeos derivados apresentarem apenas um resíduo aminoacídico envolvido na ligação a LPS conservado, as atividades

antimicrobianas são diferentes. Enquanto que o peptídeo derivado do Grupo E ($pI = 9,19$) apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas marinhas e contra o fungo *F. oxysporum*, o peptídeo derivado do Grupo D ($pI = 4,37$) não foi ativo contra esses microrganismos (ROSA *et al.*, 2013). Dessa maneira, além da presença de resíduos aminoacídicos específicos, o pI da região entre cisteínas pode interferir diretamente na atividade antimicrobiana dos ALFs.

A diversidade dos ALFs de camarões peneídeos também foi verificada na distribuição da sua expressão gênica. Todos os genes se mostraram expressos em hemócitos circulantes, porém transcritos de alguns Grupos também foram detectados em outros tecidos. Dado que esses animais apresentam um sistema circulatório aberto/semiaberto, é esperado que a expressão de genes relacionados ao sistema imune em diferentes tecidos esteja associada à presença de hemócitos infiltrados. Estudos de expressão de peneidinas demonstram que essa família de AMPs é expressa constitutivamente em hemócitos granulares (DESTOUMIEUX *et al.*, 2000) e a sua detecção em outros tecidos está associada a infiltração hemocitária (MUÑOZ *et al.*, 2002). A detecção de ALFs em hemócitos infiltrados foi demonstrada por SOMBOONWIWAT *et al.* (2008). Os autores realizaram a imunodeteção de ALFs do Grupo B em lâminas histológicas de cefalotórax e tecido muscular, confirmando que a expressão gênica desse Grupo de ALFs é restrita a hemócitos infiltrados (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008). Apesar de clara a importância dos hemócitos na expressão dos ALFs, neste trabalho foi observada uma alta expressão de ALFs do Grupo C em brânquias e do Grupo F em estômago. Curiosamente, a alta expressão de ALFs dos Grupos C e F em outros tecidos além de hemócitos foi reportado em outras espécies de camarões peneídeos como *M. japonicus* (JIANG *et al.*, 2015), *P. monodon* (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2016) e *F. chinensis* (LI *et al.*, 2015). Em conjunto com os resultados obtidos neste trabalho, é provável que outros tecidos possam contribuir na expressão de alguns genes de ALFs.

Até o momento, nenhum estudo de sinergismo de atividade dos diferentes Grupos de ALFs foi realizado. SCHMITT *et al.* (2012) demonstraram que as diferentes defensas da ostra *Crassostrea gigas* apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana quando avaliadas em conjunto, mesmo que individualmente apresentem baixa atividade. O efeito do sinergismo entre diferentes famílias de AMPs, assim como entre Grupos de uma mesma família, tem sido demonstrado como importante componente das respostas de defesa antimicrobianas (SCHMITT *et al.*, 2012). Levando em consideração a diversidade de

ALFs encontrada em uma mesma espécie, a diversidade observada nos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* e o fato de que os ALFs de todos os Grupos são expressos em hemócitos, é provável que os diferentes Grupos de ALFs atuem em sinergismo para ampliar a resposta de defesa antimicrobiana. Estudos buscando avaliar o sinergismo de ALFs colaborariam para melhor caracterizar a atividade antimicrobiana dessa família, especialmente dos Grupos D e F que se mostram pouco ativos em testes *in vitro*.

Os ALFs dos Grupos E e G apresentam um perfil de expressão ao longo do desenvolvimento similar ao de AMPs expressos exclusivamente em hemócitos. A expressão de genes envolvidos no sistema imune ao longo do desenvolvimento de *L. vannamei* foi anteriormente avaliada por QUISPE *et al.*, (2016). Os autores demonstraram que as peneídeas, as crustinas e os ALFs dos Grupos A, B e D apresentam um perfil de expressão similar (QUISPE *et al.*, 2016). Devido à grande importância dos hemócitos na expressão desses AMPs, a sua detecção se dá principalmente a partir do estágio de Náuplios V em conjunto com a produção dessas células (QUISPE *et al.*, 2016; MUÑOZ *et al.*, 2002;). Curiosamente, ALFs do Grupo C (QUISPE *et al.*, 2016) e do Grupo F apresentaram um perfil de expressão gênica diferenciado dos demais AMPs. Os níveis de transcritos desses genes nos estágios larvais e pós-larvais foram bastante elevados em relação aos encontrados em hemócitos de animais juvenis. Esse resultado pode estar associado à contribuição de outros tecidos na expressão desses genes, assim como a importância dessas moléculas ao longo do desenvolvimento do camarão.

Levando em consideração a distribuição da expressão gênica e o perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento, é provável que ALFs dos Grupos C e F sejam expressos em outros tecidos como brânquias e estômago. Além da expressão em hemócitos, a expressão de AMPs em tecidos epiteliais é considerado um importante mecanismo de defesa em invertebrados (DAVIS; ENGSTRÖM, 2012). Na mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, foi demonstrado que apesar de o corpo gorduroso ser o principal tecido produtor de AMPs, a indução da expressão local de AMPs é observada em alguns tecidos epiteliais (TZOU *et al.*, 2000). Até o momento, nenhum estudo em camarões peneídeos demonstrou efetivamente a expressão de AMPs por tecidos epiteliais. Além dos indícios reportados neste estudo com ALFs, alguns estudos de expressão gênica de crustinas em diferentes espécies de camarões peneídeos indicam que outros tecidos, além dos hemócitos, também possam contribuir para a sua expressão (SUN *et al.*, 2010; VATANAVICHARN *et al.*, 2009). Contudo, a fim de confirmar essa

hipótese se fazem necessários estudos comparativos de hibridização *in situ* e imunodeteção em diferentes tecidos.

Neste trabalho foi demonstrado que a expressão de ALFs em hemócitos é modulada não apenas por infecções microbianas, mas também pela injúria tecidual causada na infecção experimental. A indução da expressão frente à injúria pode estar associada a padrões moleculares associados a perigo (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs). DAMPs são capazes de ativar as vias de sinalização celular culminando na ativação da família NF- κ B/Rel de fatores de transcrição (NEWTON; DIXIT, 2012), que regulam a expressão de uma série de moléculas do sistema imune, incluindo os AMPs (SILVERMAN; MANIATIS, 2001). Dessa maneira, a lesão tecidual e liberação de DAMPs pode induzir a expressão de ALFs de maneira inespecífica a infecções. Curiosamente, ao avaliar o perfil de expressão de ALFs em intestino médio observa-se que ALFs dos Grupos A e C foram modulados especificamente pela infecção com *V. harveyi*. O envolvimento desses Grupos nas respostas de defesa antibacterianas também foi reportado por de la VEGA *et al.* (2008) e PONPRATEEP *et al.* (2012). Os autores demonstraram que o silenciamento pós-transcricional por RNA de interferência desses Grupos de ALFs leva a um aumento da susceptibilidade de camarões a infecções por bactérias do gênero *Vibrio*. ALFs do Grupo C também se mostraram envolvidos no controle da microbiota comensal encontrada na hemolinfa de *M. japonicus* (WANG *et al.*, 2014). Em conjunto esses resultados apontam o papel essencial de ALFs nas respostas de defesa de camarões peneídeos e o seu possível envolvimento no controle da microbiota intestinal de *L. vannamei*.

Por fim, foi demonstrado que os ALFs compõem uma família altamente diversa com papel essencial nas respostas de defesa de camarões peneídeos. Essa família representa um interessante alvo de estudos a fim de compreender o envolvimento da diversidade de AMPs nas relações patógeno-hospedeiro. O seu envolvimento nas respostas de defesa contra patógenos de relevância aquícola reforçam a utilização desses genes como marcadores para seleção de camarões peneídeos mais resistentes ao cultivo. Além disso, os ALFs (em especial os dos Grupos B, C e G) apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana em baixas concentrações. Peptídeos derivados da região entre cisteínas de ALFs apresentam uma atividade antimicrobiana similar a molécula inteira, facilitando a produção em larga escala dessas moléculas para aplicação biotecnológica. Dessa maneira, os ALFs representam um interessante alvo de estudos para produção de antibióticos derivados de AMPs.

7. PRINCIPAIS RESULTADOS

- Os ALFs de camarões peneídeos compõem uma família multigênica diversa composta por, pelo menos, sete Grupos com assinaturas aminoácídicas e características bioquímicas distintas;
- Os ALFs de *L. vannamei* apresentam uma estrutura 3D conservada composta por 3 α -hélices e 4 folhas- β ;
- Os resíduos aminoácídicos envolvidos na ligação a LPS não são conservados nos diferentes Grupos de ALFs de *L. vannamei*;
- Os ALFs de *L. vannamei* são expressos majoritariamente em hemócitos de camarões não manipulados e têm sua expressão induzida tanto pela injúria tecidual, quanto por infecções microbianas;
- O perfil de expressão de ALFs é diverso ao longo do desenvolvimento embrionário e altos níveis de expressão foram quantificados nos estágios larvais e pós-larvais indicando a importância dessa família de AMPs ao longo do desenvolvimento do camarão *L. vannamei*;
- Peptídeos derivados da região entre cisteínas dos três novos Grupos de ALFs identificados em *L. vannamei* (*Litvan* ALF-E a -G) apresentaram um espectro de atividade antimicrobiana distinto reforçando a divergência funcional entre os Grupos de ALFs.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

8.1. Conclusões

Os ALFs de camarões peneídeos compreendem uma família multigênica de AMPs diversa em termos de sequência, características bioquímicas, perfil transcricional e atividade antimicrobiana.

8.2. Perspectivas

- Comparar a diversidade de ALFs observada em camarões peneídeos com outros grupos taxonômicos de crustáceos.
- Realizar uma reconstrução filogenética com sequências nucleotídicas e aminoacídicas de ALFs de crustáceos a fim de compreender a relação filogenética entre os diferentes Grupos de ALFs;
- Realizar ensaios comparativos de afinidade de ligação entre ALFs dos sete Grupos e diferentes componentes microbianos (LPS, LTA e β -glicana);
- Localizar os sítios de expressão dos diferentes ALFs (em especial ALFs dos Grupos C e F) em outros tecidos além de hemócitos por hibridização *in situ*;
- Investigar a participação de ALFs dos Grupos D, E, F e G nas respostas de defesa *in vivo* a partir do seu silenciamento pós-transcricional via RNA de interferência;
- Avaliar o envolvimento de ALFs no controle da microbiota intestinal de camarões *L. vannamei*;
- Comparar a atividade antimicrobiana dos peptídeos derivados da região entre cisteínas dos novos Grupos de ALFs com a atividade do peptídeo maduro inteiro;
- Avaliar o efeito do sinergismo na atividade antimicrobiana *in vitro* de ALFs;
- Avaliar o efeito citotóxico e a estabilidade de peptídeos derivados da região entre cisteínas de ALFs.

REFERÊNCIAS

- AMPARYUP, P. *et al.* Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *penaeus monodon*. **Molecular immunology**, 2008. v. 45, n. 4, p. 1085–1093.
- BARRACO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Inmunología del Camarón pp. 169-224. In: MORALES, V.; CUELLAR-ANJEL, J. **Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, 2014. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews microbiology**, 2005. v. 3, n. 3, p. 238–250.
- BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological reviews**, 2004. v. 198, n. 1, p. 169–184.
- CADORET, J. P. *et al.* Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *crassostrea gigas*. **FEBS letters**, 1999. v. 460, n. 1, p. 81–85.
- CHOUDHARY, A. *et al.* Current status and future prospects of marine natural products (MNPs) as antimicrobials. **Marine drugs**, 2017. v. 15, n. 272, p. 1-42.
- DAVIS, M. M.; ENGSTRÖM, Y. Immune response in the barrier epithelia: lessons from the fruit fly *drosophila melanogaster*. **Journal of innate immunity**, 2012. v. 4, n. 3, p. 273–283.
- 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**, 2008. v. 45, n. 7, p. 1916–1925.
- DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. *et al.* Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **Journal of biological chemistry**, 2001. v. 276, n. 50, p. 47070–47077.

_____. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. **Philosophical transactions of the royal society B**, 2016. v. 371, n. 1695. p 1-11.

DESTOUMIEUX, D. *et al.* Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *penaeus penaeidins*, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *penaeus vannamei* (decapoda). **Journal of biological chemistry**, 1997. v. 272, n. 45, p. 28398–28406.

_____. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **European journal of biochemistry**, 1999. v. 266, n. 2, p. 335–346.

_____. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of cell science**, 2000. v. 113, n. 3, p. 461-469.

FALCHETTI, M. L. B. Caracterização molecular e do perfil transcricional do peptídeo antimicrobiano stylicina no camarão *Litopenaeus vannamei*. 2016. 79 p. **Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. **FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation; fisheries and aquaculture department**, 2016

GARGIONI, R.; BARRACCO, M. A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, 1998. v. 236, n. 3, p. 209–221.

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

GROSS, P. S. *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the atlantic white shrimp, *L. setiferus*. **Developmental & comparative immunology**, 2001. v. 25, n. 7, p. 565–577.

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

HARRIS, F.; DENNISON, S.; PHOENIX, D. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Current protein & peptide science**, 2009. v. 10, n. 6, p. 585–606.

HERBINIÈRE, J. *et al.* Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (terrestrial isopod, crustacean). **Developmental & comparative immunology**, 2005. v. 29, n. 6, p. 489–499.

HILCHIE, A. L.; WUERTH, K.; HANCOCK, R. E. W. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Nature chemical biology**, 2013. v. 9, p. 761-768.

HOESS, A. *et al.* Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution. **The EMBO journal**, 1993. v. 12, n. 9, p. 3351–3356.

IWANAGA, S. Biochemical principle of *Limulus* test for detecting bacterial endotoxins. **Proceedings of the japan academy, series b**, 2007. v. 83, n. 4, p. 110–119.

IWANAGA, S.; KAWABATA, S. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, 1998. v. 3, p. 973-984.

JIANG, H. S. *et al.* A new group of anti-lipopolysaccharide factors from *Marsupenaeus japonicus* functions in antibacterial response. **Developmental & comparative immunology**, 2015. v. 48, n. 1, p. 33–42.

JIRAVANICHPAISAL, P. *et al.* Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern. **Developmental & comparative immunology**, 2007. v. 31, n. 5, p. 441–455.

LEE, D. O. C.; WICKINS, J. F. Crustacean Farming: Ranching and Culture. **Journal of Crustacean Biology**, 2003. v. 23, p. 497–498.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of drosophila melanogaster. **Annual review of immunology**, 2007. v. 25, n. 1, p. 697–743.

LI, S. *et al.* Functional diversity of anti-lipopolysaccharide factor isoforms in shrimp and their characters related to antiviral activity. **Marine drugs**, 2015. v. 13, n. 5, p. 2602–2616.

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

LIU, J. *et al.* A new anti-lipopolysaccharide factor (ALF) gene with its SNP polymorphisms related to WSSV-resistance of *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, 2014. v. 39, n. 1, p. 24–33.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, 2001. v. 25, n. 4, p. 402–408.

MCKENNA, M. Antibiotic resistance: the last resort. **Nature**, 2013. v. 499, n. 7459, p. 394–396.

MORITA, T. *et al.* Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). **Journal of biochemistry**, 1985. v. 97, n. 6, p. 1611–20.

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

NAGOSHI, H. *et al.* Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having a LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. **Molecular immunology**, 2006. v. 43, n. 13, p. 2061–2069.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold spring harbor perspectives in biology**, 2012. v. 4, n. 3, p. 1-20.

PATAT, S. A. *et al.* Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the pacific white shrimp. **European journal of biochemistry**, 2004. v. 271, n. 23–24, p. 4825–4833.

PETTERSEN *et al.* UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, 2004. v. 25, p. 1605-1612.

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

PRAPAVORARAT, A.; PONGSOMBOON, S.; TASSANAKAJON, A. Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. **Developmental & comparative immunology**, 2010. v. 34, n. 6, p. 611–617.

QUISPE, R. L. *et al.* Transcriptional profiling of immune-related genes in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ontogenesis. **Fish & shellfish immunology**, 2016. v. 58, p. 103–107,

RANGANATHAN, S. *et al.* The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. **Journal of molecular graphics and modelling**, 1999. v. 17, n. 2, p. 106–113.

REN, Q. *et al.* Three different anti-lipopolysaccharide factors identified from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish & shellfish immunology**, 2012. v. 33, n. 4, p. 766–774.

ROLLAND, J. L. *et al.* Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Molecular immunology**, 2010. v. 47, n. 6, p. 1269–1277.

ROSA, R. D. *et al.* Functional divergence in shrimp anti-lipopopolysaccharide factors (ALFs): from recognition of cell wall components to antimicrobial activity. **PLOS one**, 2013. v. 8, n. 7, p. 1–11.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate survival journal**, 2010. v. 7, p. 262–284.

ROSA, R. D.; STOCO, P. H.; BARRACCO, M. A. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for anti-lipopopolysaccharide factors (ALFs) in brazilian palaemonid and penaeid shrimps. **Fish & shellfish immunology**, 2008. v. 25, n. 5, p. 693–696.

SCHMITT, P. *et al.* Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental & comparative immunology**, 2012. v. 37, n. 3–4, p. 363–370.

SCHMITT, P.; ROSA, R. D.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. An intimate link between antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial membranes. **Biochimica et biophysica acta (BBA) - biomembranes**, 2016. v. 1858, n. 5, p. 958–970.

SCHNAPP, D.; KEMP, G. D.; SMITH, V. J. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **European journal of biochemistry**, 1996. v. 240, n. 3, p. 532–539.

SEIFFERT, W.; COSTA, S. W.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista Panorama da Aquicultura**, 2006. v. 15, p.51-53.

SELSTED, M. E.; OUELLETTE, A. J. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. **Trends in cell biology**, 1995. v. 5, n. 3, p. 114–119.

SILVEIRA, A. S. *et al.* An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental & comparative immunology**, 2018. v. 79, p. 44–50.

SILVERMAN, N.; MANIATIS, T. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. **Genes & development**, 2001. n. 617, p. 2321–2342.

SOMBOONWIWAT, K. *et al.* Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and comparative immunology**, 2005. v. 29, n. 10, p. 841–851.

_____. 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**, 2008. v. 32, n. 10, p. 1170–1176.

SOONTHORNCHAI, W. *et al.* Differentially expressed transcripts in stomach of *Penaeus monodon* in response to AHPND infection. **Developmental & comparative immunology**, 2016. v. 65, p. 53–63.

STEINER, H. *et al.* Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, 1981. v. 292, n. 5820, p. 246–248.

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

_____. An anti-lipopolysaccharide factor from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, exhibited antimicrobial activities in vitro and in vivo. **Fish & shellfish immunology**, 2011. v. 30, n. 1, p. 295–303.

SUPUNGUL, P. *et al.* Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine biotechnology**, 2002. v. 4, n. 5, p. 487–494.

_____. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. **Diseases of aquatic organisms**, 2004. v. 61, p. 123–135.

_____. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental & comparative immunology**, 1 jan. 2008. v. 32, n. 1, p. 61–70.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 2013. v. 30, n. 12, p. 2725–2729.

TANAKA, S. *et al.* Limulus anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of limulus coagulation system. **Biochemical and biophysical research communications**, 1982. v. 105, n. 2, p. 717–723.

TASSANAKAJON, A.; SOMBOONWIWAT, K.; AMPARYUP, P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. **Developmental & comparative immunology**, 2015. v. 48, n. 2, p. 324–341.

TASSANAKAJON, A *et al.* Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. **Developmental & comparative immunology**, 2018. v. 80, p. 81-93.

THARNTADA, S. *et al.* Anti-lipopolysaccharide factors from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, are encoded by two genomic loci. **Fish & shellfish immunology**, 2008. v. 24, n. 1, p. 46–54.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, 1994. v. 22, n. 22, p. 4673–4680.

TZOU, P. *et al.* Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. **Immunity**, 2000. v. 13, n. 5, p. 737–748.

van VALEN. Molecular evolution as predicted by natural selection. **Journal of molecular evolution**, 1974. v.3, p.89-101.

VATANAVICHARN, T. *et al.* Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustinPm5, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon*. **Comparative biochemistry and physiology part b: biochemistry and molecular biology**, 2009. v. 153, n. 3, p. 244–252.

WANG, P. H. *et al.* The shrimp IKK–NF- κ B signaling pathway regulates antimicrobial peptide expression and may be subverted by white spot syndrome virus to facilitate viral gene expression. **Cellular and molecular immunology**, 2013. v. 10, p. 423–434.

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**, 2014. v. 289, n. 17, p. 11779–11790.

WANG, Y. C.; CHANG, P. S.; CHEN, H. Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, 2007. v. 23, n. 6, p. 1161–1177.

WILMES, M. *et al.* Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. **Natural product reports**, 2011. v. 28, n. 8, p. 1350–1359.

YANG, Y. *et al.* Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. **Journal of biological chemistry**, 2003. v. 278, n. 38, p. 36859–36867.

_____. NMR structure of *rALFPm3*, an anti-lipopopolysaccharide factor from shrimp: model of the possible lipid a binding site. **Biopolymers**, 2009. v. 91, n. 3, p. 207–220.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Sequências de ALFs utilizadas

Grupo de ALF	Espécie	GenBank	Nomenclatura da sequência		Peptídeo maduro			Região entre cisteínas		
			Literatura	Dissertação	n° aa	MM (kDa)	pI	n° aa	MM (kDa)	pI
Grupo A	<i>Litopenaeus vannamei</i>	EW713395	<i>Litvan</i> ALF-A1a	<i>Litvan</i> ALF-A1a	98	11,49	7,09	22	2,94	9,39
		FE087264	<i>Litvan</i> ALF-A2	<i>Litvan</i> ALF-A1b	98	11,52	8,06	22	2,97	9,84
	<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01066862	-	<i>Farazt</i> ALF-A1	98	11,48	6,45	22	2,94	9,39
	<i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	GFRT01025471	-	<i>Fenpen</i> ALF-A1	98	11,49	7,09	22	2,94	9,39
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	JX853777	<i>Fc</i> ALF4	<i>Fenchi</i> ALF-A1	98	11,45	6,06	22	2,94	9,39
	<i>Penaeus monodon</i>	EF523561	ALFPm2	<i>Penmon</i> ALF-A1	98	11,43	6,46	22	2,94	9,39
	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AB453738	<i>Marjap</i> ALF-A1	<i>Marjap</i> ALF-A1	98	11,49	5,88	22	2,93	9,39

APÊNDICE 1 – Sequências de ALFs utilizadas (continuação)

Grupo de ALF	Espécie	GenBank	Nomenclatura da sequência		Peptídeo maduro			Região entre cisteínas		
			Literatura	Dissertação	n° aa	MM (kDa)	pI	n° aa	MM (kDa)	pI
Grupo B	<i>Litopenaeus vannamei</i>	DQ208702	ALF AV-R	<i>Litvan</i> ALF-B1a	97	11,1	10,17	22	2,77	10,04
		DQ208703	ALF AA-K	<i>Litvan</i> ALF-B1b	97	11,07	10,09	22	2,77	10,04
	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	KC346373	<i>Litsty</i> ALF-B1	<i>Litsty</i> ALF-B1	98	11,14	10,24	22	2,79	10,04
	<i>Litopenaeus schmitti</i>	DQ991357	<i>Litsch</i> ALF-B1	<i>Litsch</i> ALF-B1	98	11,14	10,18	22	2,79	10,04
	<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01068264	-	<i>Farazt</i> ALF-B1	98	11,23	10,08	22	2,82	9,93
	<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	EF601051	<i>Farpau</i> ALF-B1	<i>Farpau</i> ALF-B1	98	11,19	10,17	22	2,85	10,04
	<i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	GFRT01025680	-	<i>Fenpen</i> ALF-B1	98	11,15	10,11	22	2,81	10,04
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	AY859500	<i>Fenchi</i> ALF-B1	<i>Fenchi</i> ALF-B1	98	11,2	10,29	22	2,85	9,93
	<i>Fenneropenaeus indicus</i>	GU727863	<i>Fenind</i> ALF-B1	<i>Fenind</i> ALF-B1	98	11,19	10,09	22	2,85	9,93
	<i>Penaeus monodon</i>	EF523559	ALFPm3	<i>Penmon</i> ALF-B1	98	11,05	9,95	22	2,84	9,93
	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	-	<i>Mj</i> ALF-B1	<i>Marjap</i> ALF-B1	98	11,04	9,64	22	2,81	9,7

APÊNDICE 1 – Sequências de ALFs utilizadas (continuação)

Grupo de ALF	Espécie	GenBank	Nomenclatura da sequência		Peptídeo maduro			Região entre cisteínas		
			Literatura	Dissertação	nº aa	MM (kDa)	pI	nº aa	MM (kDa)	pI
Grupo C	<i>Litopenaeus vancouverensis</i>	FE153599	<i>Litvan</i> ALF-C1	<i>Litvan</i> ALF-C1a	98	11,06	9,5	22	2,85	10,32
		FE079755	<i>Litvan</i> ALF-C7	<i>Litvan</i> ALF-C1b	98	11,11	9,50	22	2,85	10,32
	<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01066953	-	<i>Farazt</i> ALF-C1	98	11,06	9,5	22	2,85	10,32
	<i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	GFRT01017039	-	<i>Fenpen</i> ALF-C1	98	11,25	9,77	22	2,85	10,32
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	JX853775	<i>Fc</i> ALF2	<i>Fenchi</i> ALF-C1	98	11,09	9,18	22	2,85	10,32
		JX853776	<i>Fc</i> ALF3	<i>Fenchi</i> ALF-C2	98	11	5,27	22	2,74	8,68
	<i>Penaeus monodon</i>	JN562340	ALFPm6	<i>Penmon</i> ALF-C1a	98	11,28	9,77	22	2,85	10,32
		HM136828	<i>Penmon</i> ALF-C1a	<i>Penmon</i> ALF-C1b	98	11,08	9,77	22	2,85	10,32
		KX431031	ALFPm7	<i>Penmon</i> ALF-C2a	98	11,14	8,74	22	2,71	8,03
		JR209860	-	<i>Penmon</i> ALF-C2b	98	11,12	8,05	22	2,71	8,03
	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	-	<i>Mj</i> ALF-C2	<i>Marjap</i> ALF-C1a	98	11,27	9,51	22	2,85	10,32
		AB210110	<i>Marjap</i> ALF-C1	<i>Marjap</i> ALF-C1b	98	11,3	7,98	22	2,9	9,84
		-	<i>Mj</i> ALF-C1	<i>Marjap</i> ALF-C1c	98	11,3	7,98	22	2,9	9,84

APÊNDICE 1 – Sequências de ALFs utilizadas (continuação)

Grupo de ALF	Espécie	GenBank	Nomenclatura da sequência		Peptídeo maduro			Região entre cisteínas		
			Literatura	Dissertação	nº aa	MM (kDa)	pI	nº aa	MM (kDa)	pI
Grupo D	<i>Litopenaeus vannamei</i>	FE156649	<i>Litvan</i> ALF-D4c	<i>Litvan</i> ALF-D1a	98	10,78	5,58	22	2,48	4,03
		FE152534	<i>Litvan</i> ALF-D2	<i>Litvan</i> ALF-D1b	98	10,75	5,58	22	2,48	4,03
	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	DQ010421	<i>Litsty</i> ALF-D1	<i>Litsty</i> ALF-D1	98	10,81	6,10	22	2,49	4,37
	<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01067287	-	<i>Farazt</i> ALF-D1	98	10,82	5,6	22	2,48	4,03
	<i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	GFRT01004925	-	<i>Fenpen</i> ALF-D1	98	10,74	5,72	22	2,44	4,37
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	JX853779	<i>Fc</i> ALF6	<i>Fenchi</i> ALF-D1	98	10,77	5,23	22	2,45	4,37
	<i>Penaeus monodon</i>	GEME01010116	-	<i>Penmon</i> ALF-D1	98	10,8	5,26	22	2,42	4,37
	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	-	<i>Mj</i> ALF-D2	<i>Marjap</i> ALF-D1	98	10,92	5,76	22	2,61	6,05

APÊNDICE 1 – Sequências de ALFs utilizadas (continuação)

Grupo de ALF	Espécie	GenBank	Nomenclatura da sequência		Peptídeo maduro			Região entre cisteínas		
			Literatura	Dissertação	n° aa	MM (kDa)	pI	n° aa	MM (kDa)	pI
Grupo E	<i>Litopenaeus vannamei</i>	HAAW01015656	-	<i>Litvan</i> ALF-E1a	99	11,1	6,11	22	2,71	9,19
		FE069658	-	<i>Litvan</i> ALF-E1b	99	11,11	6,11	22	2,71	9,19
	<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01004511	-	<i>Farazt</i> ALF-E1	99	11,17	5,63	22	2,7	9,19
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	JX853778	<i>Fc</i> ALF5	<i>Fenchi</i> ALF-E1	99	11,12	5,64	22	2,65	9,24
	<i>Penaeus monodon</i>	GEEP01059175	-	<i>Penmon</i> ALF-E1	99	11,06	6,12	22	2,68	9,24
	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	-	<i>Mj</i> ALF-E2	<i>Marjap</i> ALF-E1	101	11,4	5,33	22	2,63	9,31
Grupo F	<i>Litopenaeus vannamei</i>	KJ000049	nLvALF1	<i>Litvan</i> ALF-F1a	98	11,28	8,62	22	2,64	9,24
		FE151434	-	<i>Litvan</i> ALF-F1b	98	11,26	8,98	22	2,64	9,24
	<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01070429	-	<i>Farazt</i> ALF-F1	98	11,15	9,47	22	2,73	10,31
	<i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	GFRT01004448	-	<i>Fenpen</i> ALF-F1	98	11,06	8,66	22	2,52	9,31
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	JX853774	<i>Fc</i> ALF1	<i>Fenchi</i> ALF-F1	98	11,06	8,64	22	2,54	8,82
	<i>Penaeus monodon</i>	GEME01077326	-	<i>Penmon</i> ALF-F1	98	11,07	9,04	22	2,52	9,31
	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	-	<i>Mj</i> ALF-D1	<i>Marjap</i> ALF-F1	98	11,32	9,20	22	2,6	9,24

APÊNDICE 1 – Sequências de ALFs utilizadas (continuação)

Grupo de ALF	Espécie	GenBank	Nomenclatura da sequência		Peptídeo maduro			Região entre cisteínas		
			Literatura	Dissertação	n° aa	MM (kDa)	pI	n° aa	MM (kDa)	pI
Grupo G	<i>Litopenaeus vannamei</i>	GETZ01049665	-	<i>Litvan</i> ALF-G1a	105	12,12	5,02	22	2,85	10,2
		FE153497	-	<i>Litvan</i> ALF-G1b	105	12,1	5,05	22	2,88	10,2
	<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01069818	-	<i>Farazt</i> ALF-G1	105	11,94	5,86	22	2,75	9,9
	<i>Penaeus monodon</i>	JR205808	-	<i>Penmon</i> ALF-G1	105	12,23	6,13	22	2,85	9,9
	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	-	<i>Mj</i> ALF-A2	<i>Marjap</i> ALF-G1	102	11,55	5,25	22	2,77	10,47

APÊNDICE 2 – Sequências de Scygonadinas utilizadas

Espécie	Nomenclatura		GenBank
	Literatura	Dissertação	
<i>Scyla Serrata</i>	Scygonadin-1	Scyser Scy-1a	AAW57403
	Scygonadin SSAP	Scyser Scy-1b	ABM05493
	Scygonadin-2	Scyser Scy-2	ABI96918