



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PPG EM BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

LUIZ GUSTAVO VASCONCELOS MACHADO

**ANÁLISE MOLECULAR E TRANSCRICIONAL DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS ENVOLVIDOS NA RELAÇÃO FUNGO-
HOSPEDEIRO DE CAMARÕES-ROSA DO GÊNERO *Farfantepenaeus***

FLORIANÓPOLIS

2019

Luiz Gustavo Vasconcelos Machado

**ANÁLISE MOLECULAR E TRANSCRICIONAL DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS ENVOLVIDOS NA RELAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO DE
CAMARÕES-ROSA DO GÊNERO *Farfantepenaeus***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.
Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis

2019

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

Machado, Luiz Gustavo Vasconcelos Machado
Análise molecular e transcricional de peptídeos
antimicrobianos envolvidos na relação fungo-hospedeiro de
camarões-rosa do gênero Farfantepenaeus / Luiz Gustavo
Vasconcelos Machado Machado ; orientador, Rafael Diego da
Rosa, 2019.
74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Crustáceos. 3. Peptídeos antimicrobianos. 4. Diversidade
molecular. 5. Fusarioses. I. da Rosa, Rafael Diego. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III.
Título.

Luiz Gustavo Vasconcelos Machado

Análise molecular e transcricional de peptídeos antimicrobianos envolvidos na relação fungo-hospedeiro de camarões-rosa do gênero *Farfantepenaeus*

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Gislaine Fongaro
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Luisa Damazio Rona Pitaluga
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Profa. Dra. Evelise Maria Nazari

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Orientador

Florianópolis, 30 de outubro de 2019

Este trabalho é dedicado à minha família, amigos e todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC por todas as oportunidades concedidas e pela disponibilidade de sua infraestrutura e ao PPG em Biologia Celular e do Desenvolvimento e seus professores por todo o conhecimento que me passaram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de pesquisa que auxiliou a me dedicar a este trabalho.

Agradeço aos membros da banca Prof^ª Dr^ª Gislaine Fongaro, Prof^ª Dr^ª Luisa Damazio Rona Pitaluga, Prof^ª Dr^ª Luciane Maria Perazzolo e Prof. Dr. Glauber Wagner pela disponibilidade de avaliar este trabalho e pela contribuição prestada.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa, não apenas pela dedicada e competente orientação deste trabalho, mas, sobretudo, pelo estímulo e confiança passados durante a minha jornada. Obrigado pela amizade, confiança, carinho, conhecimento, apoio, paciência e disponibilidade dedicados. Te admiro muito, és um exemplo como pessoa e profissional para mim.

Agradeço à Prof^ª Dr^ª Luciane Maria Perazzolo que foi fundamental para o desenvolvimento de toda esta etapa importante de minha vida e com que contribuiu muito para a minha formação.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos da UFSC, em especial meus colegas de laboratório do LIAA. Obrigado pelo convívio, amizade, apoio, generosidade e ensinamentos que me auxiliaram para completar essa etapa da minha formação acadêmica.

Agradeço à minha família por me apoiarem em todas minhas decisões e me ajudarem de todas as maneiras possíveis para eu realizar os meus objetivos.

Aos meus amigos Ana Caroline, Ana Luiza, Alysson, Ariadne, Caroline, Ellen, Emannelly, Felipe, Flávia, Géssica, Karolline, Laís, Layssa, Luana, Lucas, Maiara, Mylena, Renato e Vanessa, que sempre me apoiam, me escutam e me incentivam. Que eu continue com o privilégio de ter vocês presentes na minha vida.

Aos meus amigos Camila, German e Talita que estiveram sempre disponíveis para mim desde os primeiros momentos e me auxiliarem de todas as maneiras possíveis para passar por essa etapa da minha vida. Sou muito grato a todos pela confiança que depositaram em mim, vocês foram uma parte crucial para a realização desse trabalho. Obrigado.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são antibióticos naturais de origem proteica amplamente distribuídos entre os seres vivos e que atuam diretamente no combate a diferentes classes de microrganismos, como bactérias, fungos e vírus. Atualmente, foram identificadas quatro famílias de AMPs codificadas por genes em camarões peneídeos: peneidinas, fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs), crustinas e stylicinas. Atualmente, muitos relatos dessas famílias estão restritos a espécies de interesse econômico e pouco ainda se sabe sobre sua diversidade em espécies nativas. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar, em nível molecular e transcricional, os diferentes membros das quatro famílias de AMPs de camarões peneídeos em espécies de camarões-rosa do gênero *Farfantepenaeus*. A identificação de sequências codificantes de AMPs nas diferentes espécies de camarões-rosa foi realizada por análises *in silico* (buscas em bancos de dados anotados e não anotados) e por técnicas de biologia molecular (clonagem molecular e sequenciamento nucleotídico). Dos quatro membros da família das peneidinas (PEN1/2 a PEN5), foram identificados apenas sequências codificantes de PEN1/2 e PEN4. Por outro lado, todos os sete membros da família dos ALFs (ALF-A a ALF-G) foram identificados em camarões-rosa. Em relação às crustinas, foram identificadas sequências codificantes para os subtipos IIa e IIb, que representam os membros mais abundantes em camarões peneídeos. Assim como descrito para camarões do gênero *Litopenaeus*, foram identificadas duas stylicinas (STY1 e STY2). Os resultados dessas análises sugerem que a diversificação das quatro famílias de AMPs aconteceu num ancestral comum aos camarões dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus*. Finalmente, o perfil transcricional de todos os genes identificados foi avaliado nos hemócitos (células do sistema imune) de camarões da espécie *F. paulensis* experimentalmente infectados com o fungo patogênico *Fusarium solani*. Com exceção do gene ALF-G, todos os AMPs mostraram-se expressos nos hemócitos. Enquanto que a expressão do gene ALF-B foi induzida em 24 h, o gene STY2 foi modulado negativamente após 48 h da infecção fúngica. Os resultados deste estudo evidenciam a diversidade molecular dos AMPs de camarões-rosa em termos de sequências, características bioquímicas e perfil transcricional frente a infecções.

Palavras-chave: crustáceos, diversidade molecular, sistema imune de invertebrados, fusariose.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are natural antibiotics of protein origin widely distributed across the living organisms, acting directly against different classes of microorganisms, such as bacteria, fungi and viruses. From the 14 AMP families described in crustaceans, four of them were identified and characterized in penaeid shrimp: penaeidins, anti-lipopolysaccharide factors (ALFs), crustins and stylicins. Currently, most of the studies have been focused on species of economic importance and little is still known about the occurrence and diversity of AMPs in native penaeid species. In this context, the aim of this study was to identify and characterize, at molecular and transcriptional levels, sequences encoding for the different members of the four shrimp AMP families in pink shrimp species from the genus *Farfantepenaeus*. The identification of the AMP sequences in the different species was performed by *in silico* analysis (searches in annotated and non-annotated databases) and by molecular biology methods (molecular cloning and nucleotide sequencing). From the four members of the penaeidin family (PEN1/2 to PEN5), only sequences encoding for PEN1/2 e PEN4 were identified. On the other hand, all seven members of the ALF family (ALF-A to ALF-G) were identified in pink shrimp. Regarding the crustins, both subtypes IIa and IIb were found, which represent the most abundant crustin members in penaeid shrimp. As described for shrimp species from the genus *Litopenaeus*, two stylicins (STY1 and STY2) were identified in pink shrimp. Altogether, results from these analyses suggest that the diversification of the four shrimp AMP families occurred in a common ancestor of *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus*. Finally, the transcriptional profile of all identified genes was assessed in the hemocytes (immune cells) from *F. paulensis* shrimp experimentally infected with the pathogenic filamentous fungus *Fusarium solani*. With the exception of ALF-G, all AMP genes showed to be transcribed in hemocytes. While the expression of ALF-B was induced at 24 h, the STY2 gene was negatively modulated at 48 h in response to the fungal infection. The results from this study evidence the molecular diversity of AMPs from pink shrimp species in terms of sequences, biochemical features and gene expression profile upon infections.

Keywords: crustaceans, molecular diversity, invertebrate immunity, fusariosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Camarões infectados por fungos filamentosos do gênero <i>Fusarium</i>	16
Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo clássico de ação dos AMPs.....	18
Figura 3 - Modelos estruturais das peneidinas (PEN)	20
Figura 4 - Espectro de atividade antimicrobiana das peneidinas	21
Figura 5 - Modelos estruturais e características bioquímicas dos ALFs de camarões peneídeos.....	23
Figura 6 - Espectro de atividade antimicrobiana dos ALFs	24
Figura 7 - Representação esquemática da estrutura primária dos quatro Tipos (I a IV) de crustinas.....	25
Figura 8 - Espectro de atividade biológica (antimicrobiana e antiproteolítica) das crustinas..	26
Figura 9 - Representação esquemática da estrutura primária das stylicinas.....	27
Figura 10 - Espectro de atividade antimicrobiana da stylicina 1 (STY1) de <i>Litopenaeus stylirostris</i>	28
Figura 11 - Esquema ilustrativo da infecção experimental com o fungo <i>Fusarium solani</i>	31
Figura 12 - Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida de <i>Farpau</i> PEN4.....	40
Figura 13 - Modelos tridimensionais (3D) de sequências representativas das peneidinas de <i>Litopenaeus vannamei</i> e de <i>Farfantepenaeus</i>	41
Figura 14 - Alinhamento das sequências aminoacídicas dos quatro subgrupos de peneidinas (PEN1/2 a PEN5) da subfamília I	42
Figura 15 - Representação gráfica, na forma de cladograma, das relações entre as sequências das duas subfamílias de peneidinas	43
Figura 16 - Alinhamento das sequências aminoacídicas dos sete Grupos de ALFs	46
Figura 17 - Modelos tridimensionais (3D) de sequências representativas dos sete Grupos de ALFs de <i>Farfantepenaeus aztecus</i> e <i>Litopenaeus vannamei</i>	47
Figura 18 - Representação gráfica, na forma de cladograma, das relações entre as sequências dos ALFs de camarões peneídeos.....	48
Figura 19 - Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida de Crustin-like <i>Fpau</i>	49
Figura 20 - Alinhamento das sequências aminoacídicas das Crustinas dos subtipos IIa e IIb.	51
Figura 21 - Representação gráfica, na forma de cladograma, das relações entre as sequências das crustinas dos Tipos I e II de camarões peneídeos	52
Figura 22 - Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida de <i>Fpau</i> -Stylicin1	53
Figura 23 - Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida de <i>Fpau</i> -Stylicin2	54
Figura 24 - Alinhamento das sequências aminoacídicas das stylicinas (STY1, STY2 e STY)	55

Figura 25 - Representação gráfica, na forma de cladograma, das relações entre as sequências das Stylicinas	56
Figura 26 - Representação gráfica da linha evolutiva dos AMPs de camarões peneídeos.....	57
Figura 27 - Coeficiente de estabilidade dos candidatos à referência.....	58
Figura 28 - Níveis transcricionais dos AMPs de <i>Farfantepenaeus paulensis</i> em resposta ao fungo <i>Fusarium solani</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo	34
Tabela 2 - Propriedades bioquímicas das peneidinas de camarões do gênero <i>Farfantepenaeus</i>	40
Tabela 3 - Propriedades bioquímicas dos ALFs de camarões do gênero <i>Farfantepenaeus</i>	45
Tabela 4 - Propriedades bioquímicas das crustinas de camarões do gênero <i>Farfantepenaeus</i>	50
Tabela 5 - Propriedades bioquímicas das stylicinas de camarões do gênero <i>Farfantepenaeus</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALF – fator anti-lipopolissacarídeo

AMPs – *Antimicrobial peptides*

AAMPs – *Anionic Antimicrobial Peptides*

CAMPs – *Cationic Antimicrobial Peptides*

cDNA – DNA complementar

Cq – Ciclo de quantificação

CRUS – crustina

DAMP – Padrão molecular associado ao perigo

DWD – *Double WAP domain*

EST – *Expressed sequence tags*

Exo – Exonuclease

LB – *Lysogeny broth medium*

LPS – Lipopolissacarídeo

LTA – Ácido lipoteicoico

MAS – Solução de Alsever modificada

MIQE – *Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*

PDB – *Protein data bank*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PEN – peneidina

pI – Ponto isoelétrico teórico

RNAi – RNA de interferência

RT-PCR – Transcrição reversa seguida de PCR

RT-qPCR – Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real

SAP – *Shrimp alkaline phosphatase*

SOC – *Super optimal broth with catabolite repression*

STY – stylicina

SWD – *Single WAP domain*

TSA – *Transcriptome shotgun assembly*

WAP – *Whey acidic protein*

WGS – *Whole genome shotgun*

WSSV – Vírus da síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)	17
1.2	PENEIDINAS (PEN)	19
1.3	FATORES ANTI-LIPOPOLISSACARÍDEOS (ALFs)	22
1.4	CRUSTINAS (CRUS).....	24
1.5	STYLICINAS (STY)	27
2	HIPÓTESE CIENTÍFICA	30
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	ANIMAIS	Erro! Indicador não definido.
4.2	INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O FUNGO PATOGÊNICO <i>Fusarium solani</i>	31
4.3	EXTRAÇÃO DO RNA E SÍNTESE DE CDNA	31
4.4	PROSPECÇÃO <i>IN SILICO</i> DE AMPs EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Farfantepenaeus</i>	33
4.5	ESCOLHA DOS INICIADORES	33
4.6	TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	34
4.7	CLONAGEM MOLECULAR	34
4.8	SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO PELO MÉTODO DE SANGER.....	35
4.9	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	36
4.10	ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	37
4.10.1	Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real	37
4.10.2	Seleção dos genes de referência	37
4.10.3	Cálculo de expressão gênica relativa e análise estatística	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

5.1	IDENTIFICAÇÃO DE AMPs EM CAMARÕES-ROSA DO GÊNERO <i>Farfantepenaeus</i>	39
5.1.1	Identificação e caracterização de peneidinas (PEN)	40
5.1.2	Identificação e caracterização de fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)	45
5.1.3	Identificação e caracterização de crustinas (CRUS)	49
5.1.4	Identificação e caracterização de stylicinas (STY)	54
5.2	PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS AMPs DE <i>F. PAULENSIS</i> FRENTE A INFECÇÕES FÚNGICAS	58
6	PRINCIPAIS RESULTADOS	62
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE A – Sequências de peneidinas utilizadas.....	69
	APÊNDICE B – Sequências de ALFs utilizadas	70
	APÊNDICE C – Sequências de crustinas utilizadas	71
	APÊNDICE D – Sequências de stylicinas utilizadas	72

1 INTRODUÇÃO

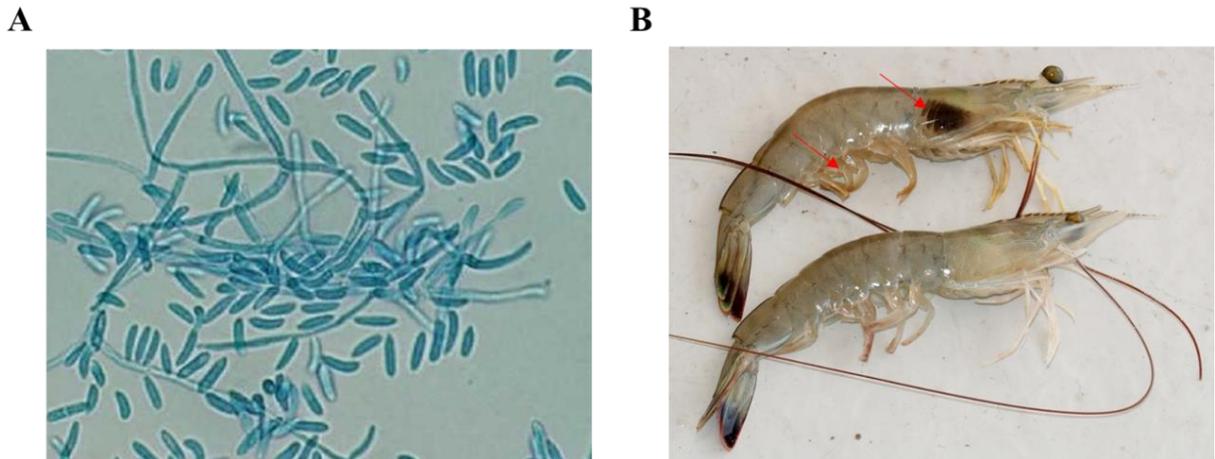
Os organismos estão em constante contato, em seu ambiente natural, com uma grande diversidade de microrganismos. Embora a maioria dessas relações seja de ordem simbiótica ou comensal, alguns microrganismos podem ser patogênicos e pôr em risco a saúde e sobrevivência de seus hospedeiros. No cenário evolutivo, para que os hospedeiros possam sobreviver aos agentes infecciosos, eles devem desenvolver, continuamente, mecanismos de defesa fisiológicos e comportamentais para evitar e controlar as infecções. Os patógenos, por sua vez, devem desenvolver estratégias para ultrapassar essas novas defesas impostas pelo hospedeiro (SEM *et al.*, 2016). O desenvolvimento dessas medidas de defesa e contra defesa gera uma “corrida armamentista” em que ambos os seres devem estar em constante evolução. A superação dos mecanismos desenvolvidos por um dos lados pode resultar, em último caso, na extinção de uma das partes (COSTEIRA *et al.*, 2007).

Um dos modelos mais aceitos que explicam a coevolução que ocorre na interação patógeno-hospedeiro é a dinâmica conhecida como “Hipótese da Rainha Vermelha” (VALEN, 1973). Essa dinâmica faz referência ao trecho “*É preciso correr o máximo possível para permanecermos no mesmo lugar*”, proferido pela personagem Rainha Vermelha no livro “Alice Através do Espelho” (CARROL, 1871). No contexto evolutivo, essa frase pode ser interpretada como a exigência de uma alteração contínua e constante entre organismos que interagem entre si (VALEN, 1973).

Por viverem em um ambiente com uma grande quantidade e diversidade de microrganismos, os crustáceos evoluíram sob uma pressão seletiva imposta principalmente por vírus, bactérias e fungos filamentosos. Desses, poucos podem ser considerados como “patógenos autênticos”, sendo a maioria oportunistas que se desenvolvem apenas sob situações de estresse do hospedeiro. Um exemplo de patógenos oportunistas são os fungos filamentosos do gênero *Fusarium*. Em camarões, esses fungos são responsáveis pela enfermidade chamada de fusariose ou “doença das brânquias negras” (**Figura 1**) (COVARRUBIAS, 2004). Animais infectados com esses fungos apresentam lesões nas brânquias, cutícula e apêndices, com uma resposta inflamatória muito intensa (melanização). Essas lesões acabam comprometendo as funções desses tecidos, fazendo com que os animais tenham dificuldades de locomoção, respiração, alimentação e reprodução. Essas lesões podem

servir ainda como porta de entrada para outros patógenos, agravando o quadro sintomatológico da doença (MORALES & CUÉLLAR-ANJEL, 2014).

Figura 1. Camarões infectados por fungos filamentosos do gênero *Fusarium*.



(A) Esporos do fungo *Fusarium solani* corados com lactofenol azul-algodão (aumento 40×) (reproduzido de ANDRÉS *et al.*, 2018). (B) Camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* com fusariose. As setas vermelhas mostram a melanização das brânquias e dos pleópodos. (reproduzido de ZELDOVICH, 2015).

Para prevenir e combater infecções, os camarões contam com diferentes tipos de mecanismos de defesa. A primeira linha de defesa é proporcionada por um exoesqueleto rígido, que atua como uma barreira físico-química contra a entrada de microrganismos. Além disso, grande parte do intestino, importante porta de entrada de patógenos, é revestida por quitina e apresenta um ambiente ácido e cheio de enzimas capazes de destruir muitos microrganismos (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010). Quando essas barreiras são ultrapassadas, é desencadeada uma série de reações imunológicas internas, com o objetivo de neutralizar e eliminar esses microrganismos invasores. Essas reações são mediadas por um sistema imune do tipo inato, que está intimamente ligado à hemolinfa (BARRACO *et al.*, 2014). A hemolinfa, análoga ao sangue dos mamíferos, é composta por uma fração celular (hemócitos) e por uma fração líquida (plasma) contendo os fatores humorais.

Os mecanismos de defesa de camarões estão essencialmente divididos em respostas celulares e humorais, que atuam em sinergismo protegendo-os de invasões e infecções microbianas (BARRACO *et al.*, 2014). As principais respostas celulares de defesa são: (1) fagocitose dos microrganismos, (2) formação de agregados celulares (nódulos e capsulas), (3) infiltração dos hemócitos para os sítios de infecção e (4) formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos (BARRACO *et al.*, 2014). Como respostas humorais, os

camarões possuem: (1) melanização mediada pelo sistema pró-fenoloxidase (proPO), (2) proteínas de reconhecimento que se ligam a padrões moleculares associados a microrganismos, (3) aglutinação celular mediada por lectinas e (4) produção de moléculas citotóxicas, como os peptídeos antimicrobianos (BARRACO *et al.*, 2014).

1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

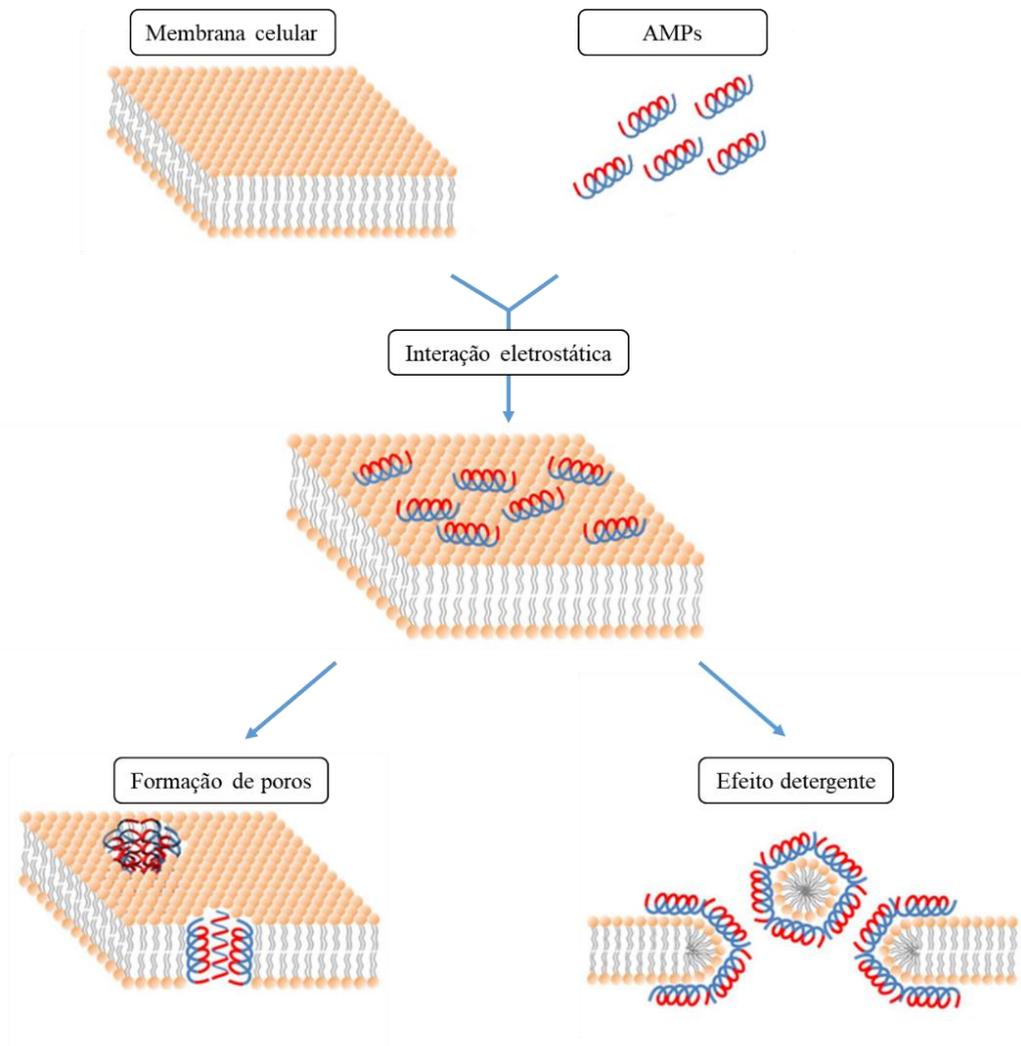
Os peptídeos antimicrobianos (*AntiMicrobial Peptides* ou AMPs) são imunofatores encontrados em todos os Reinos da vida, desde bactérias até mamíferos. Eles são considerados como “antibióticos naturais” devido a sua rápida e eficiente atividade contra diferentes classes de microrganismos. Além da atividade antimicrobiana, foi relatado que esses peptídeos podem apresentar atividade antitumoral, atividade mitogênica, antiviral e antiparasitária (KAMYSZ *et al.*, 2003). Atualmente, um banco de dados chamado *Antimicrobial Peptide Database*, com mais de 3 mil sequências de AMPs, está disponível (APD: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) a fim de auxiliar na busca do conhecimento obtido dessas moléculas e na identificação de novos AMPs (WANG *et al.*, 2016).

Os AMPs são classicamente descritos como moléculas menores que 10 kDa, de caráter catiônico (*Cationic AntiMicrobial Peptides* ou CAMPs) e anfipático, que diferem em sua sequência aminoacídica e conformação estrutural. Eles são encontrados no sangue ou em camadas epiteliais que estão expostas a microrganismos. Atualmente, foram identificadas moléculas antimicrobianas que não se adequam nas definições clássicas, como peptídeos aniônicos (*Anionic AntiMicrobial Peptides* ou AAMPs), proteínas maiores que 10 kDa e proteínas multifuncionais com atividade antimicrobiana (YOUNT *et al.*, 2006).

A atividade antimicrobiana dos AMPs está intimamente relacionada à sua conformação estrutural, carga e propriedades anfipáticas. De forma geral, os CAMPs atuam na membrana dos microrganismos, onde as porções catiônicas interagem de forma eletrostática com os fosfolípidios negativos da membrana dos microrganismos. Após essa interação, a porção hidrofóbica do peptídeo se insere na bicamada lipídica podendo ocasionar a formação de poros na membrana e/ou atuar de forma detergente (**Figura 2**) (GUANÍ-GUERRA *et al.*, 2010; BROGDEN *et al.*, 2005; YOUNT *et al.*, 2006). Os AAMPs, por outro lado, parecem interagir com receptores da membrana ou adotar estruturas anfipáticas variadas (HARRIS *et al.*, 2009). Foi proposto também que alguns AAMPs utilizam modificações pós-

transcricionais para se ligarem a íons metálicos, formando pontes de salina catiônicas para interagir com a membrana dos microrganismos (HARRIS *et al.*, 2009).

Figura 2. Representação esquemática do mecanismo clássico de ação dos AMPs.



A cor azul representa a porção hidrofóbica e a cor vermelha representa a porção hidrofílica dos AMPs (adaptado de BAHAR & REN, 2013).

Essas moléculas antimicrobianas são componentes essenciais do sistema imune de vários organismos e são produzidos por diferentes células e tecidos de acordo com cada organismo (ZASLOFF, 2002). Em *Drosophila*, por exemplo, a síntese dessas moléculas ocorre principalmente no corpo gorduroso, as quais são secretadas para a hemolinfa (TZOU *et al.*, 2000). Em outros artrópodes, como os crustáceos, os AMPs são sintetizados principalmente pelos hemócitos, células de defesa do sistema imune, podendo ser secretados para a hemolinfa do animal e/ou estocados em grânulos citoplasmáticos (ROSA & BARRACCO, 2010).

O primeiro AMP caracterizado em crustáceos foi um peptídeo catiônico isolado da hemolinfa do caranguejo *Carcinus maenas*, que apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SCHNAPP *et al.*, 1996). Atualmente, foram identificadas 13 famílias de AMPs em crustáceos, com características bioquímicas diversas (ROSA & BARRACCO, 2010). Dessas famílias, cinco foram descritas em camarões peneídeos, das quais quatro são AMPs codificados por genes: as peneidinas (PEN) (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997), os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) (GROSS *et al.*, 2001), as crustinas (CRUS) (BARTLETT *et al.*, 2002) e as stylicinas (STY) (ROLLAND *et al.*, 2010). A quinta família é composta por peptídeos gerados a partir de modificações pós-traducionais da região C-terminal da hemocianina, proteína carreadora de oxigênio de crustáceos (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2001).

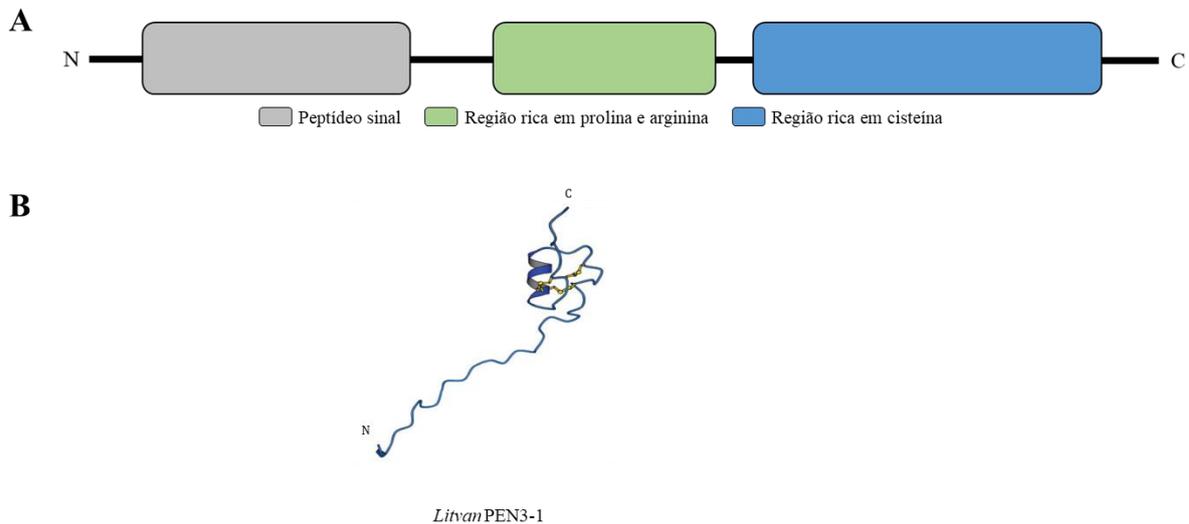
1.2 PENEIDINAS (PEN)

As peneidinas (PEN) foram os primeiros AMPs identificados e caracterizados em camarões peneídeos. Elas foram originalmente isoladas da hemolinfa de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* através de técnicas bioquímicas (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997). As PEN são exclusivas de camarões peneídeos e representam uma das famílias de AMPs mais bem caracterizadas em crustáceos (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016; ROSA & BARRACO, 2010). As PEN são compostas por um peptídeo sinal altamente conservado, seguido de um peptídeo maduro de 4,7 a 7,2 kDa altamente catiônico (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). O peptídeo maduro é composto por uma região N-terminal contendo um domínio rico em resíduos de prolina e arginina seguido de uma região C-terminal contendo seis resíduos conservados de cisteína formando três pontes de dissulfeto (**Figura 3**) (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2003; CUTHBERTSON *et al.*, 2005). Esse peptídeo pode apresentar modificações pós-traducionais como a formação de um ácido piroglutâmico na região N-terminal e/ou amidação da sua região C-terminal (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997, 2000a).

Baseado na sequência aminoacídica e em características bioquímicas, as peneidinas foram classificadas em duas subfamílias (I e II) (MI *et al.* 2016). A subfamília I é composta por quatro membros: PEN1/2, PEN3, PEN4 e PEN5. O subgrupo PEN5 foi relatado apenas em camarões asiáticos (KANG *et al.*, 2007). A subfamília II é composta por um único

membro identificado no camarão *Marsupenaeus japonicus*, *MjPen-II* (MI *et al.* 2016). Cada PEN é codificada por um gene distinto, porém apresentam uma organização estrutural muito semelhante: dois éxons separados por um único íntron. O gene PEN3 de *L. vannamei*, por sua vez, é composto por apenas um éxon (O'LEARY AND GROSS, 2006). Apesar de suas diferenças em composição aminoacídica, as estruturas terciárias da PEN3 de *L. vannamei* (YANG *et al.*, 2003) e da PEN4 de *Litopenaeus setiferus* (CUTHBERTSON *et al.*, 2005) são bastante conservadas. Elas são compostas por uma região N-terminal linear, seguida de sua região C-terminal composta por uma hélice anfipática e duas espirais estabilizadas por três ligações dissulfeto (**Figura 3**).

Figura 3. Modelos estruturais das peneidinas (PEN).

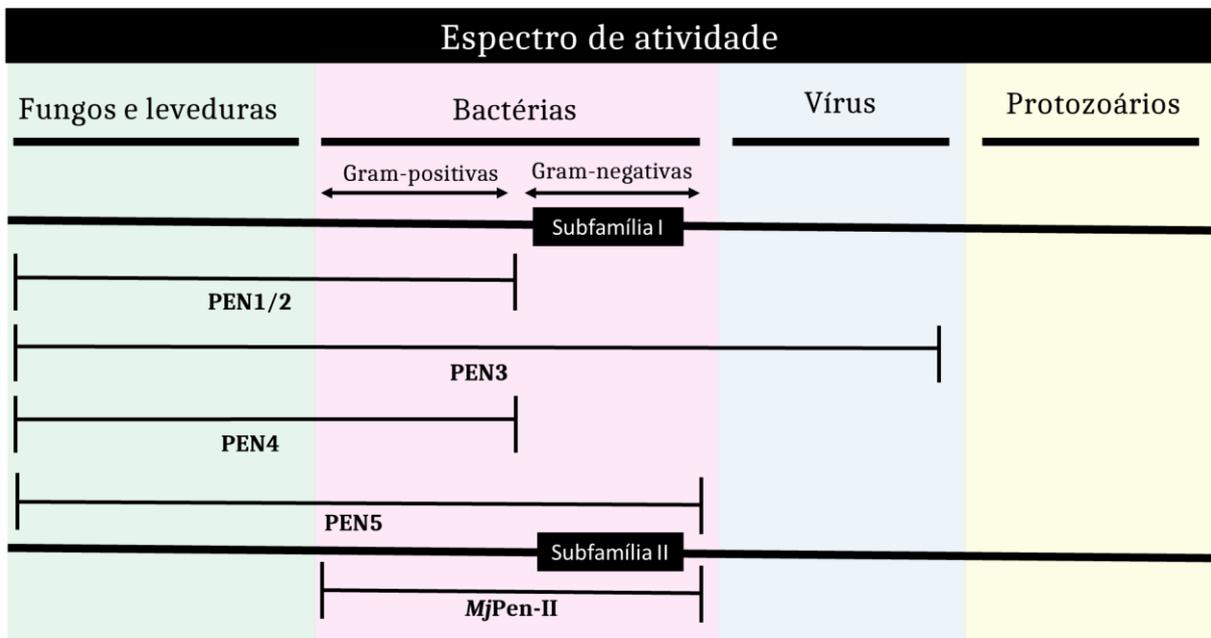


(A) Esquema da estrutura primária das peneidinas. (B) Representação da estrutura terciária da peneidina *Litvan* PEN3-1 de *Litopenaeus vannamei* (PDB: 1XV3) (YANG *et al.*, 2003).

De maneira geral, as peneidinas dos subgrupos PEN1/2, PEN3 e PEN4 apresentaram atividade antimicrobiana majoritariamente contra bactérias Gram-positivas (DESTOUMIEUX *et al.*, 2000b; CUTHBERTSON *et al.*, 2008) e contra fungos filamentosos (CUTHBERTSON *et al.*, 2006, 2008; DESTOUMIEUX *et al.*, 1999). Por outro lado, a PEN5 do camarão *Fenneropenaeus chinensis* (*Fenchi* PEN5) apresentou ainda atividade contra bactérias Gram-negativas (KANG *et al.*, 2007). A PEN3 de *L. vannamei* apresentou atividade antiviral contra o herpes-vírus simples humano do tipo 1, inibindo em mais de 85% a replicação viral (CARRIEL-GOMES *et al.*, 2007). Porém, ela não apresentou atividade antiparasitária contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (LÖFGREN *et al.*, 2007) (**Figura 4**).

Interessantemente, foi observado que a região rica em prolina e arginina de PEN4, sozinha, possui uma atividade antimicrobiana no mesmo nível que o peptídeo inteiro. Tal função não foi relatada para outros subgrupos (CUTHBERTSON *et al.*, 2004; DESTOUMIEUX *et al.*, 2000a,b). Foi reportado que a região rica em cisteína das peneidinas pode atuar como uma citocina, atraindo hemócitos para locais de injúria (LI *et al.*, 2010). Além da função de citocina, essa região também possui a habilidade de se ligar à quitina (DESTOUMIEUX *et al.*, 2000b, CUTHBERTSON *et al.*, 2004). DESTOUMIEUX e colaboradores (2000a) sugerem que tal propriedade pode conferir às peneidinas a capacidade de se ligar à quitina presente no exoesqueleto de camarões, participando dos processos de muda ou cicatrização de feridas. O mecanismo de ação das peneidinas ainda não foi desvendado.

Figura 4. Espectro de atividade antimicrobiana das peneidinas.



As peneidinas são produzidas e estocadas nos grânulos citoplasmáticos dos hemócitos livres da hemolinfa ou infiltrados em tecidos (BACHÈRE *et al.*, 2004, DESTOUMIEUX *et al.*, 2000b). Durante as primeiras horas de infecções bacterianas e fúngicas, há uma redução drástica no número de transcritos de PEN1/2 e PEN3 nos hemócitos de *L. vannamei* (BÁCHERE *et al.*, 2004). Acredita-se que essa redução seja por causa do recrutamento de

hemócitos para os tecidos infectados. Interessantemente, durante um desafio com o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), PEN3 e PEN4 apresentaram um aumento na expressão durante as primeiras horas de desafio, seguido de uma diminuição da expressão em 48 horas nos hemócitos de *L. vannamei* (XIAO *et al.*, 2018). Durante uma infecção experimental com doses letais do fungo filamentosso *F. solani* em camarões da espécie *L. vannamei*, a expressão de PEN1/2, PEN3 e PEN4 foi reduzida drasticamente. Essa redução pode ser devido a uma redução do número de hemócitos expressando peneidinas na hemolinfa por estarem sendo recrutados para os sítios de infecção (brânquias) (GONÇALVES *et al.*, 2014; MUÑOZ *et al.*, 2004).

1.3 FATORES ANTI-LIPOPOLISSACARÍDEOS (ALFs)

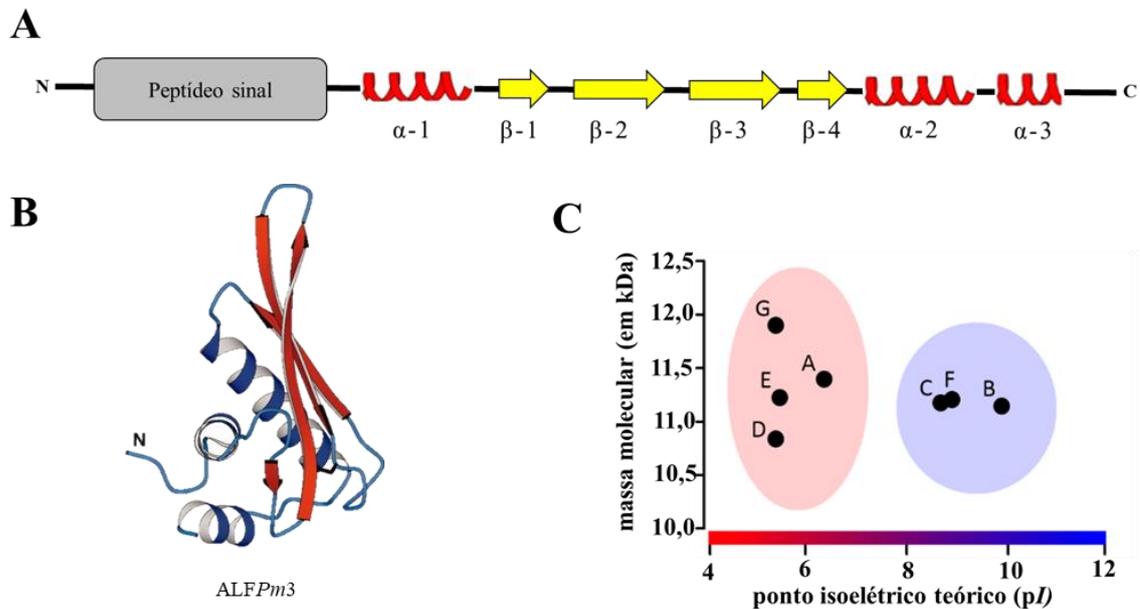
Os fatores anti-lipopolissacarídeos (*Anti-Lipopolysaccharide Factors* ou ALFs) compõem um grupo altamente diverso de AMPs encontrados exclusivamente em crustáceos (classe Malacostraca) e quelicerados marinhos. Esses peptídeos foram inicialmente identificados por métodos bioquímicos nos hemócitos dos quelicerados marinhos *Limulus polyphemus* e *Tachypleus tridentatus* (TANAKA *et al.*, 1982). Em crustáceos, os primeiros ALFs foram identificados nos camarões *L. setiferus* (GROSS *et al.*, 2001) e *Penaeus monodon* (SUPUNGUL *et al.*, 2002) por abordagens moleculares.

De maneira geral, os ALFs apresentam um peptídeo sinal seguido de um peptídeo maduro com aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos (MATTOS *et al.*, 2018). Seu peptídeo maduro possui uma região N-terminal hidrofóbica seguida de uma região contendo dois resíduos conservados de cisteína. A região entre os resíduos de cisteínas assume um formato de grampo (β -harpin) (**Figura 5**) (YANG *et al.*, 2009) que também é referido como domínio de ligação a lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas (HOESS *et al.*, 1993). Até o momento, foram resolvidas as estruturas terciárias do L-ALF de *L. polyphemus* (HOESS *et al.*, 1993) e de ALFPm3 de *P. monodon* (YANG *et al.*, 2009). Ambas estruturas apresentam três α -hélices (uma na região N-terminal e duas na região C-terminal) e quatro folhas- β (**Figura 5**), demonstrando que a estrutura dos ALFs é conservada nesses grupos (YANG *et al.*, 2009).

Os ALFs compõem uma família multigênica constitutivamente expressa nos hemócitos de camarões (MATOS *et al.*, 2018). Atualmente, foram descritos sete diferentes Grupos de ALFs em camarões peneídeos, que foram nomeados como: ALF-A (THARNTADA *et al.*, 2008), ALF-B (THARNTADA *et al.*, 2008), ALF-C (PONPRATEEP *et al.*, 2012), ALF-D

(ROSA *et al.*, 2013), ALF-E (JIANG *et al.*, 2015), ALF-F (MATOS *et al.*, 2018) e ALF-G (MATOS *et al.*, 2018). Eles foram classificados de acordo com sua composição aminoacídica e suas características bioquímicas (catiônicos: Grupos B, C e F; aniônicos: Grupos A, D, E e G) (**Figura 5**). Apesar de suas diferenças, os genes dos diferentes Grupos de ALFs apresentam uma organização estrutural semelhante: três éxons interrompidos por dois íntrons.

Figura 5. Modelos estruturais e características bioquímicas dos ALFs de camarões peneídeos.

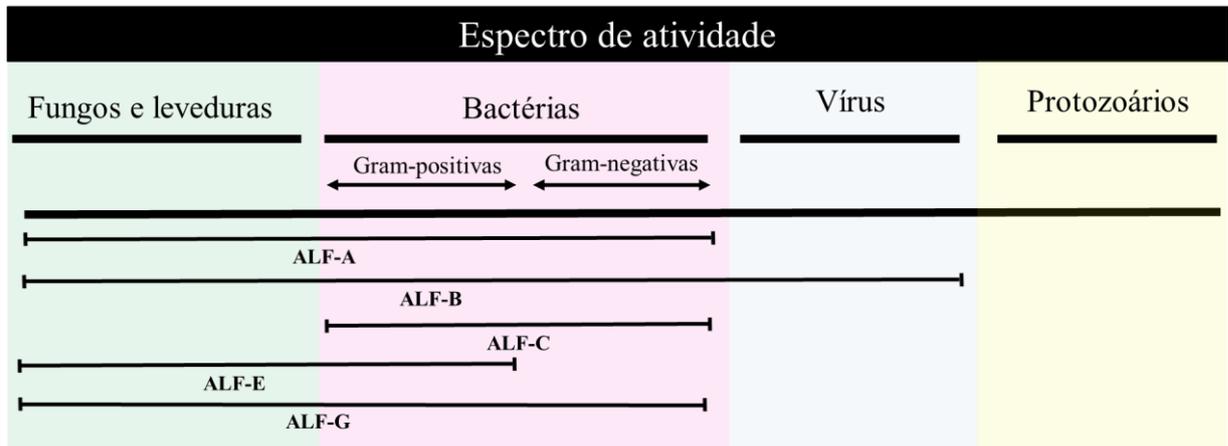


(A) Esquema da estrutura primária/secundária dos ALFs, evidenciando as 3 α -hélices (em vermelho) e as 4 folhas- β (em amarelo). (B) Modelo tridimensional de ALFPm3 do camarão *Penaeus monodon* (PDB: 2JOB; reproduzido de YANG *et al.*, 2009). (C) Relação entre a massa molecular e o ponto isoelétrico teórico dos peptídeos maduros dos diferentes Grupos de ALFs encontrados em camarões peneídeos. As letras referem-se aos respectivos Grupos de ALFs. O círculo azul agrupa os Grupos com peptídeos catiônicos enquanto que o círculo rosa agrupa os Grupos com peptídeos aniônicos (reproduzido de MATOS *et al.*, 2018).

Com essa grande variedade de formas, os ALFs apresentam um espectro de atividade antimicrobiana bastante diverso (**Figura 6**). Eles atuam contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008), fungos filamentosos (TASSANAKAJON *et al.*, 2010) e alguns vírus humanos envelopados (CARRIEL-GOMES *et al.*, 2007), porém não apresentam atividade contra protozoários (LÖFGREN *et al.*, 2008). Esse amplo espectro de atividade é devido à capacidade que os ALFs têm de se ligar a componentes microbianos, como o LPS de bactérias Gram-negativas (HOESS *et al.*, 1993), o ácido lipoteicoico (LTA)

de bactérias Gram-positivas (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008) e as β -glicanas dos fungos (SUN *et al.*, 2011).

Figura 6. Espectro de atividade antimicrobiana dos ALFs.



Devido a sua baixa atividade antimicrobiana, os Grupos ALF-D (ROSA *et al.*, 2013) e ALF-F (MATOS *et al.*, 2018) não foram ilustrados na imagem.

Em *L. vannamei*, a expressão dos ALFs foi detectada principalmente nos hemócitos e nas brânquias (MATOS *et al.*, 2018). O perfil de expressão dos ALFs frente a infecções é diverso. Durante infecções fúngicas, enquanto a expressão do ALF-A não é modulada, ocorre um aumento na expressão de outros Grupos (B, C e D) (ROSA *et al.*, 2013). A expressão dos ALFs dos Grupos B, C e F (catiônicos) e do ALF-G (aniônico) é modulada frente a injúrias, sugerindo o envolvimento desses peptídeos na cicatrização de feridas ou na regeneração tecidual (MATTOS *et al.*, 2018).

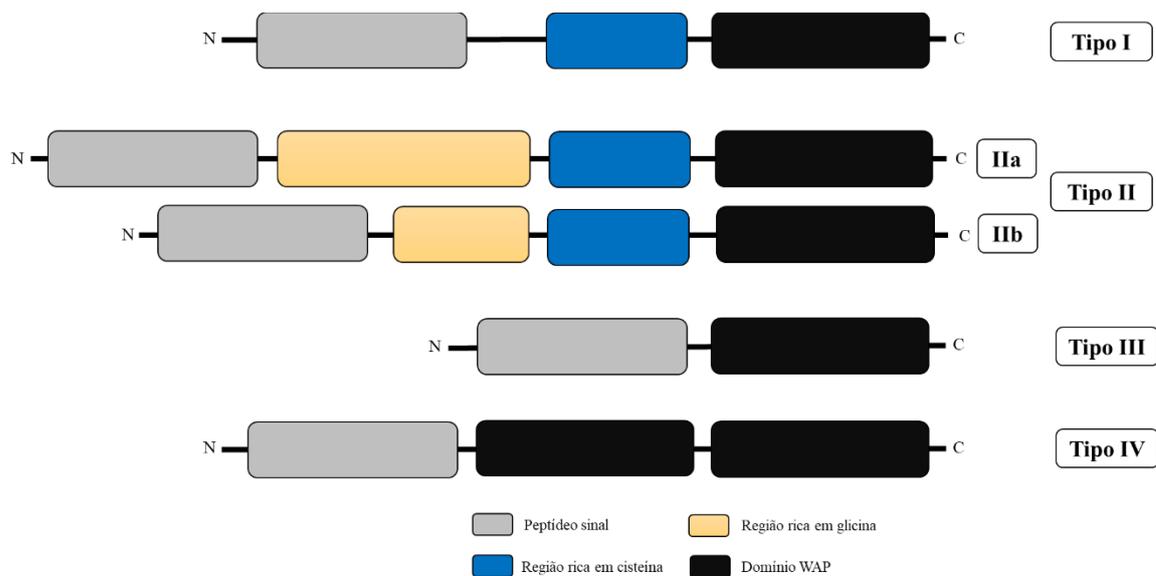
1.4 CRUSTINAS (CRUS)

As crustinas (CRUS) foram inicialmente isoladas dos hemócitos do caranguejo *C. maenas* e foram descritas como um peptídeo catiônico de 11,5 kDa (RELF *et al.*, 1999). O termo “crustina” foi proposto após a identificação de sequências homólogas em camarões peneídeos do gênero *Litopenaeus* (BARTLETT *et al.*, 2002). Apesar de o termo ser bem aceito pela comunidade científica, o primeiro membro da família identificado em *C. maenas* foi posteriormente nomeado como “carcinin” (BROCKTON *et al.*, 2007).

As crustinas compõem uma diversa família de AMPs caracterizada pela presença de um domínio WAP (*Whey Acidic Protein*) em sua extremidade C-terminal (SMITH *et al.*, 2008). O termo “WAP” é derivado do nome de uma família de proteínas descritas no soro do leite de

mamíferos roedores (HENNIGHAUSE, 1982). Esse domínio é constituído de 50 aminoácidos, onde são encontrados oito resíduos conservados de cisteína, os quais formam quatro pontes de dissulfeto (RANGANATHAN *et al.*, 1999). Até o momento, foi identificada uma ampla variedade de proteínas contendo o domínio WAP, desempenhando funções como inibição de proteases e atividade antimicrobiana (SMITH *et al.*, 2011). As crustinas não são uma família de AMPs exclusiva de crustáceos. Sequências homólogas também foram identificadas em genomas de insetos (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). De acordo com a presença ou ausência de alguns domínios estruturais, as crustinas de crustáceos podem ser classificadas em quatro diferentes grupos, chamados de “Tipos”: Tipo I ao IV (**Figura 7**) (SMITH *et al.*, 2008).

Figura 7. Representação esquemática da estrutura primária dos quatro Tipos (I a IV) de crustinas.



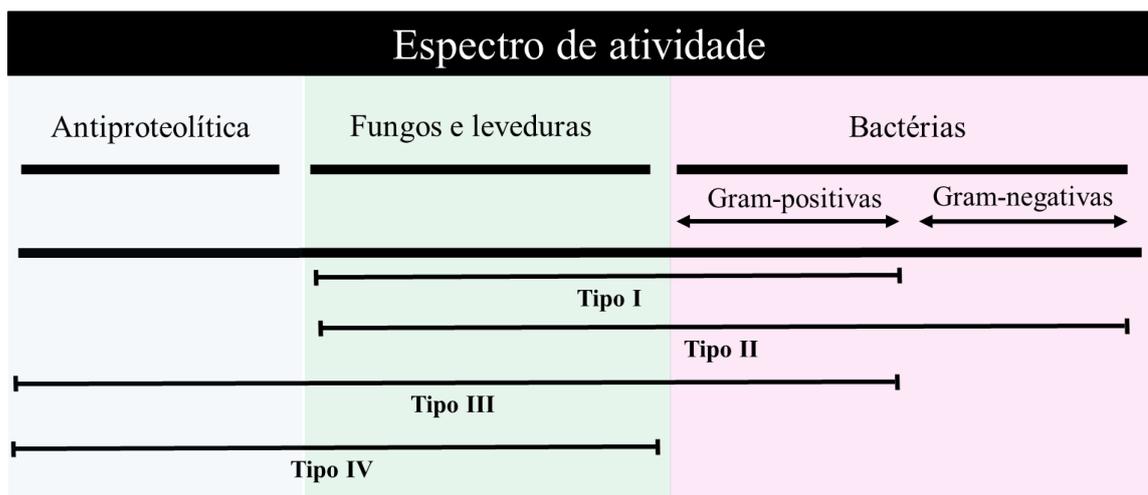
As crustinas do Tipo I são caracterizadas pela presença de um domínio rico em resíduos cisteína na extremidade N-terminal, contendo quatro resíduos arranjados em posições específicas. As crustinas do Tipo II apresentam, além desse mesmo domínio rico em cisteínas, um domínio N-terminal hidrofóbico rico em resíduos de glicina (SMITH *et al.*, 2008). As crustinas do Tipo II também são subdivididas em dois subtipos: Tipos IIa e IIb. Esses dois subtipos diferem essencialmente na presença de aminoácidos específicos posicionados em locais precisos da região C-terminal, entre o domínio rico em cisteína e o domínio WAP

(BARRETO *et al.*, 2018). As crustinas do Tipo III apresentam apenas o domínio WAP em sua estrutura, sendo referidas também como “proteínas contendo domínio WAP” (*Single WAP Domain proteins* ou SWD) (TASSANAKAJON *et al.*, 2015). Comparativamente, as crustinas do Tipo IV apresentam dois domínios WAP (*Double WAP Domain proteins* ou DWD) (DU *et al.*, 2009).

As crustinas são codificadas por genes diferentes. Os Tipos I e III são codificados por genes contendo 4 éxons interrompidos por 3 íntrons (BROCKTON *et al.*, 2007; IMJONGJIRAK *et al.*, 2009; AMPARYUP *et al.*, 2008). Ambas crustinas do Tipo II (IIa e IIb) são codificadas por genes contendo dois éxons interrompidos por um íntron (BARRETO *et al.*, 2018). Até o momento, não se conhece a estrutura gênica do Tipo IV.

As crustinas possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (Tipos I, II e III), Gram-negativas (Tipo II) e fungos filamentosos e leveduras (Tipos I, II, III e IV) (SUPUNGUL *et al.*, 2008; TASSANAKAJON *et al.*, 2015). (**Figura 8**). No entanto, a sua atuação não é restrita a uma atividade antimicrobiana. Estudos relatam que alguns Tipos possuem atividade antiproteolítica (Tipo III e IV) (AMPARYUP *et al.*, 2008b; TASSANAKAJON *et al.*, 2015). O mecanismo de ação das crustinas, no entanto, permanece desconhecido.

Figura 8. Espectro de atividade biológica (antimicrobiana e antiproteolítica) das crustinas.



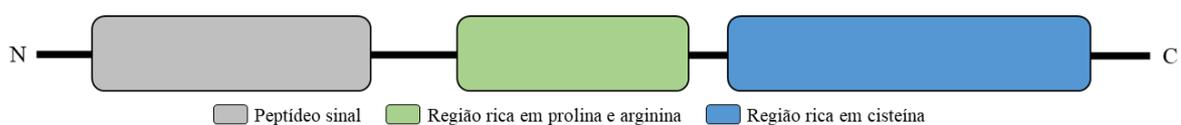
As crustinas do Tipo II são um dos tipos melhor caracterizados. Estudos de genômica funcional através de técnicas de RNA de interferência (RNAi) demonstraram que as crustinas do Tipo IIa participam das respostas antimicrobianas *in vivo* contra bactérias do gênero *Vibrio*, porém não contra fungos filamentosos do gênero *Fusarium* (SHOCKEY *et al.*, 2009).

Em crustáceos, as crustinas do Tipo I são majoritariamente hemocitárias, enquanto ambas crustinas do Tipo II (IIa e IIb) são expressas nos hemócitos e nas brânquias. As crustinas dos Tipos III e IV são expressas exclusivamente nos hemócitos. Em camarões infectados com a bactéria Gram-positiva *Vibrio anguillarum*, crustinas dos Tipos III e IV apresentaram níveis transcricionais elevados nas primeiras horas após infecção (DU *et al.*, 2015). Em infecções fúngicas, as crustinas do Tipo IIa apresentam uma redução nos seus níveis transcricionais nas primeiras horas pós-infecção (GONÇALVES *et al.*, 2014).

1.5 STYLICINAS (STY)

As stylicinas (STY) constituem a mais recente família de AMPs descrita em camarões peneídeos. Elas foram descobertas através de um estudo transcritômico que observou que esse gene se apresenta abundantemente expresso em camarões da espécie *Litopenaeus stylirostris* capazes de sobreviver a infecções causadas por bactérias do gênero *Vibrio* (DE LORGERIL *et al.*, 2005). As STY apresentam um peptídeo sinal, seguido de um peptídeo maduro aniônico (~ 9 kDa) contendo uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e uma região C-terminal contendo 13 resíduos conservados de cisteína (**Figura 9**) (ROLLAND *et al.*, 2010). A sua estrutura tridimensional ainda não foi resolvida.

Figura 9. Representação esquemática da estrutura primária das stylicinas.

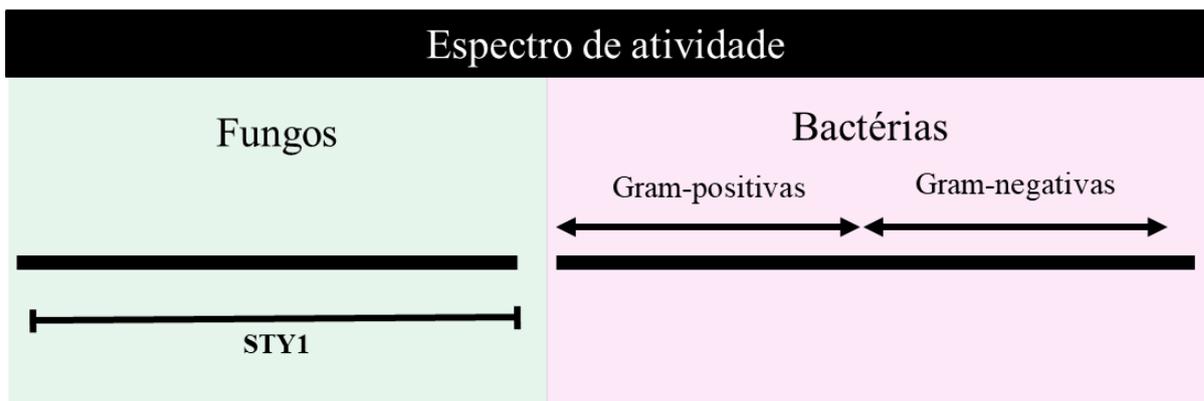


Assim como as PEN, as STY são AMPs exclusivos de camarões peneídeos. Esses AAMPs foram relatados nos camarões *L. stylirostris* (DE LORGERIL *et al.*, 2005), *M. japonicus* (LIU *et al.*, 2015) e *L. vannamei* (FARIAS *et al.*, 2019). Em camarões do gênero *Litopenaeus* foram identificadas duas stylicinas, denominadas de STY1 e STY2 (ROLLAND *et al.*, 2010; FARIAS *et al.*, 2019;), enquanto em *M. japonicus* foi encontrado apenas um membro dessa família. A estrutura gênica das STY é bastante conservada: dois éxons

nterrompidos por um íntron (ROLLAND *et al.*, 2010;; LIU *et al.*, 2015; FARIAS *et al.*, 2019).

ROLLAND e colaboradores (2010) verificaram que STY1 de *L. stylirostris* apresenta atividade específica contra fungos filamentosos (**Figura 10**). Os autores também demonstraram que esses AAMPs são capazes de aglutinar bactérias Gram-negativas *in vitro*, devido a uma potente atividade de ligação ao LPS. Seu mecanismo de ação permanece desconhecido. Até o momento, não foi relatada a atividade antimicrobiana *in vitro* de STY2.

Figura 10. Espectro de atividade antimicrobiana da stylicina 1 (STY1) de *Litopenaeus stylirostris*.



As stylicinas são constitutivamente expressas nos hemócitos e nas células epiteliais do intestino médio de camarões (FARIAS *et al.*, 2019). Os níveis transcricionais de STY1 e STY2 são reduzidos drasticamente em camarões *L. vannamei* infectados com o fungo *F. solani* (GONÇALVES *et al.*, 2014). Enquanto a expressão da STY2 é modulada nos hemócitos circulantes, a expressão do STY1 não é modulada em *L. vannamei* durante uma infecção com o patógeno *Vibrio harveyi*. Em *M. japonicus*, houve uma diminuição na expressão de STY nas brânquias e no hepatopâncreas durante as primeiras horas após a infecção com WSSV (LIU *et al.*, 2015).

Atualmente, muito do que se conhece sobre os AMPs de crustáceos está restrito a espécies de interesse econômico e pouco ainda se sabe sobre a presença, diversidade e função desses efetores em espécies nativas, incluindo camarões-rosa. A busca de AMPs em outras espécies de camarão é um importante meio para o entendimento do sistema imune desses animais e de sua capacidade de resistir a infecções. Devido a sua atividade biológica rápida e de amplo espectro, os AMPs de camarões peneídeos representam uma nova variedade de antibióticos de origem natural, que podem ser utilizados em aquicultura, e em saúde humana e animal, com o objetivo de implantar métodos alternativos no combate a enfermidades. Dessa

maneira, esses compostos podem substituir a utilização de antibióticos convencionais que vêm gerando um crescente número de microrganismos resistentes (CHEUNG *et al.*, 2015).

2 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os diferentes membros das quatro famílias de peptídeos antimicrobianos (AMPs) de camarões peneídeos são expressos nos hemócitos de espécies do gênero *Farfantepenaeus* e modulados frente uma infecção pelo fungo *Fusarium solani*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar, em nível molecular e transcricional, os diferentes membros das quatro famílias de AMPs de camarões peneídeos (PEN, ALF, CRUS e STY) em espécies de camarões-rosa do gênero *Farfantepenaeus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar sequências codificantes das quatro famílias de AMPs de camarões peneídeos em espécies do gênero *Farfantepenaeus*;
- Caracterizar molecularmente as sequências obtidas e definir suas relações filogenéticas;
- Avaliar o perfil de expressão gênica dos diferentes AMPs nos hemócitos de camarões-rosa da espécie *F. paulensis* experimentalmente infectados com o fungo patogênico *Fusarium solani*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CAMARÕES

Neste trabalho foram utilizados camarões juvenis (6-8 g), de ambos os sexos, da espécie nativa de camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (PÉREZ-FARFANTE, 1967). A coleta e manutenção dos animais e a infecção experimental foram previamente realizadas pela aluna Priscila Gonçalves durante a realização da sua Dissertação de mestrado (GONÇALVES, 2011;). Os animais foram coletados na região de Laguna/SC (28°28'57" S; 48°46'51" W) e imediatamente transportados para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA), onde foram acondicionados em aquários contendo água do mar filtrada e aeração constante. Somente animais aparentemente saudáveis e no período de intermuda foram utilizados nos experimentos.

4.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O FUNGO PATOGÊNICO *Fusarium solani*

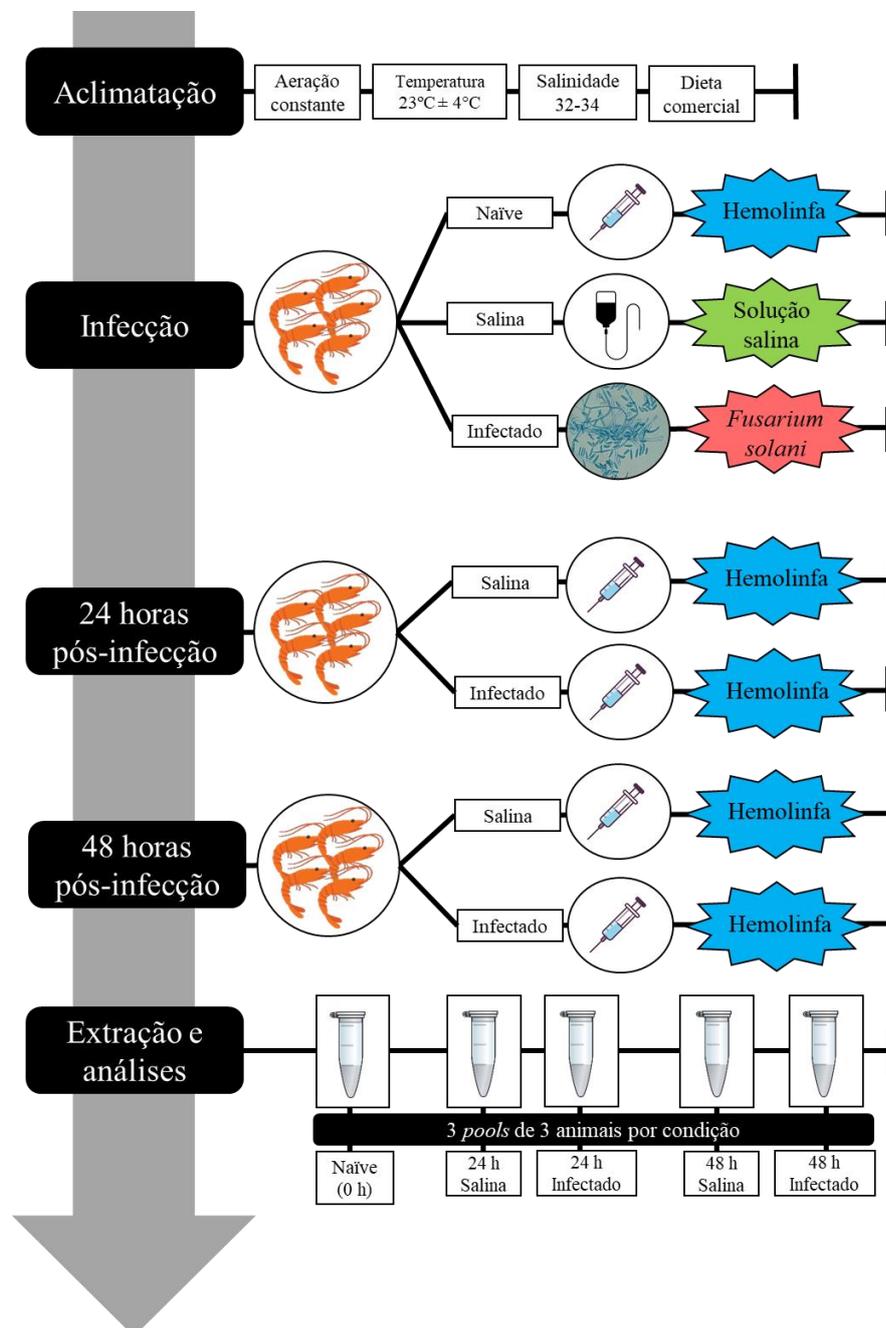
Para a infecção, os animais foram injetados intramuscularmente com 50 µL de um inóculo contendo 3×10^5 esporos (dose subletal) do fungo filamentoso *Fusarium solani* (n=9; Grupo Infectado) suspenso em solução salina estéril (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4). O preparo do inóculo foi realizado conforme descrito por GONÇALVES (2011). Como controle, foram utilizados animais não-manipulados (n=9; Grupo Naïve) e animais injetados com 50 µL da solução salina estéril (n=9; Grupo Salina). A hemolinfa foi coletada dos camarões (3 *pools* de 3 animais por condição experimental) em diferentes tempos pós-infecção (0 h, 24 h e 48 h) utilizando-se uma seringa estéril de 1 mL contendo solução anticoagulante MAS (Solução de Alsever Modificada: 115 mM glicose, 336 mM NaCl, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,0) (**Figura 11**). Os hemócitos foram recuperados por centrifugação (600 ×g por 10 min a 4°C) e suspensos em 1 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific) para a posterior extração de RNA total.

4.3 EXTRAÇÃO DO RNA E SÍNTESE DE CDNA

O RNA total foi extraído dos hemócitos utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras obtidas de RNA foram subsequentemente

tratadas com DNase I (Fermentas; 1 U/ μ L) e a concentração e pureza avaliadas em espectrofotômetro (A230/260/280 nm) (NanoVueTM, GE Healthcare). Apenas soluções de RNA com razão de absorvância (A260/280 nm) superior a 1,8 foram utilizadas nos experimentos. Para a síntese de cDNA, 1 μ g de RNA foi reversamente transcrito utilizando a enzima ImPromII (Promega), na presença de 0,5 mM de cada dNTP e 0,5 μ g do iniciador oligo (dT)₁₂₋₁₈. As amostras foram incubadas a 25°C por 5 min, a 42°C por 60 min e a 70°C durante 15 min.

Figura 11. Esquema ilustrativo da infecção experimental com o fungo *Fusarium solani*.



4.4 PROSPECÇÃO *IN SILICO* DE AMPs EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Farfantepenaeus*

Sequências nucleotídicas correspondentes aos diferentes membros de peneidinas (PEN1/2, PEN3, PEN4 e PEN5), fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF-A, ALF-B, ALF-C, ALF-D, ALF-E, ALF-F e ALG-G), crustinas (Type IIa e Type IIb) e stylicinas (STY1 e STY2) foram coletadas em bancos de dados públicos (GenBank) e utilizadas para a busca de sequências homólogas nas oito espécies conhecidas de camarões-rosa do gênero *Farfantepenaeus*: *F. aztecus*, *F. brasiliensis*, *F. brevisrostris*, *F. californiensis*, *F. duorarum*, *F. notialis*, *F. paulensis* e *F. subtilis*. As buscas foram realizadas em bancos anotados (*Nucleotide Collection*) e não anotados (*Expressed Sequence Tags* e *Transcriptome Shotgun Assembly*) utilizando-se a ferramenta tBLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foram selecionadas apenas as sequências completas com coeficientes de identidade superiores a 50% e *e-value* inferior a 10^{-15} . As sequências aminoacídicas deduzidas foram obtidas pelo programa ExPASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) enquanto que o programa SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) foi utilizado para a predição dos peptídeos sinais. A determinação dos parâmetros bioquímicos (massa molecular e ponto isoelétrico teórico) foi feita utilizando-se o programa ExPASy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>).

4.5 ESCOLHA DOS INICIADORES

Para a identificação molecular dos AMPs não encontrados nas análises *in silico*, foram escolhidos pares de iniciadores baseados nas sequências dos AMPs da espécie *L. vannamei* (BARRETO *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2018; FARIAS *et al.*, 2019). Os pares de iniciadores foram escolhidos, de forma manual, nas regiões que flanqueiam a sequência codificante (CDS ou *coding sequence*) (**Tabela 1**).

Para as análises de expressão gênica, os pares de iniciadores foram escolhidos, de forma manual, considerando-se os seguintes parâmetros: (i) temperatura de hibridização entre 56-62°C, (ii) tamanho dos iniciadores de 18-22 nucleotídeos, (iii) conteúdo de C/G entre 47-63% e (iv) tamanho do produto de amplificação entre 101-422 pb. O potencial de auto complementariedade e formação de dímeros foram verificados pelo programa FastPCR (<https://primerdigital.com/fastpcr.html>).

4.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A amplificação das sequências de interesse foi realizada pela técnica de transcrição reversa seguida de PCR convencional (RT-PCR) utilizando-se um *pool* de todas as amostras de cDNA de hemócitos de *F. paulensis*. As reações de RT-PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ L contendo 0,4 mM de dNTPs, 1 \times tampão de amplificação (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,6 mM de MgCl₂, 0,1% Triton X-100, pH 8,8), 0,2-0,4 μ M de cada iniciador (**Tabela 1**), 1 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Sinapse) e 1 μ L de cDNA. As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, hibridização a 55-56°C por 45 s, extensão a 72°C por 45 s e extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL).

4.7 CLONAGEM MOLECULAR

Os produtos de amplificação de tamanho esperado foram ligados no vetor pGEM-T Easy (Promega) utilizando-se a enzima T4 DNA ligase, conforme as instruções do fabricante. Bactérias *Escherichia coli* DH5 α quimiocompetentes foram transformadas com os plasmídeos recombinantes por choque térmico (42°C por 45 s, seguido de incubação no gelo por 2 min) e incubadas a 37°C por 90 min na presença do meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*: 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,05% NaCl, 250 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glicose). Em seguida, as bactérias foram semeadas em meio LB sólido (*Lysogeny Broth Medium*: 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) suplementado com ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (80 μ g/mL) e X-GAL (20 μ g/mL).

Para confirmar a presença do inserto, colônias de coloração branca foram selecionadas e submetidas à técnica de *PCR colony*. As reações de *PCR colony* foram realizadas em um volume final de 10 μ L contendo as colônias bacterianas selecionadas, 0,4 mM de dNTPs, 1 \times tampão de amplificação (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,6 mM de MgCl₂, 0,1% Triton X-100, pH 8,8), 0,2 μ M dos iniciadores M13-F (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') e M13-R (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') (específicos para o vetor pGEM-T Easy) e 1 U da enzima *Taq* DNA polymerase (Sinapse). Para a amplificação, foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, hibridização a 56°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a

72°C por 5 min. A partir dos resultados obtidos na *PCR colony*, as colônias de interesse foram submetidas à extração e purificação do seu DNA plasmidial utilizando o Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme as instruções do fabricante.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo.

Nome	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador antissenso (5'-3')	Produto
Identificação e clonagem molecular			
<i>Farpau</i> PEN4	CGCTCCGAGCCCGGGTTCCTC	ACCAGATTATCCTAAATGAC	243 pb
<i>Fpau</i> -Stylicin1	GACACATCCCTGCTGCCATC	TCGTTCTCGCTTCTTTATCC	335 pb
<i>Fpau</i> -Stylicin2	CTGCTGCCATCATGAAGACC	TTTATCCTTTATAGCCTCCC	330 pb
Crustin-like <i>Fpau</i>	CAGGATAAAGACAAGGCCGG	CACATGCAGGCTTATCCCTGAG	422 pb
Análises de expressão gênica (RT-qPCR)			
EF1 α	TGGCTGTGAACAAGATGGACA	TTGTAGCCACCTTCTTGACG	103 pb
RpS6	AGCAGATACCCTTGGTGAAG	GATGCAACCACGGACTGAC	193 pb
RpS3A	GGCTTGCTATGGTGTGCTCC	TCATGCTCTTGGCTCGCTG	101 pb
β -actina	CCACGAGACCACCTACAAC	AGCGAGGGCAGTGATTTTC	142 pb
<i>Farpau</i> PEN1/2	GTCTGCCTGGTCTTCTTGG	GCAGCAATTGCGAGCATCTG	168 pb
<i>Farpau</i> PEN4	GTCTGCCTGGTCTTCTTGG	TACATCGCAACCAATCGGC	170 pb
<i>Farpau</i> ALF-A	CGACGATGCGAGTCTTGCTC	AGACAAGGGCTTCAGTGCTC	379 pb
<i>Farpau</i> ALF-B	GTGTCTCCGTGTTGACAAGC	ACAGCCCAACGATCTTGCTG	123 pb
<i>Farpau</i> ALF-C	TGCGAACAACACTACTGGAC	CTGCGTAGTTCTGCCTACC	196 pb
<i>Farpau</i> ALF-D	TGTGTTGGTTGTGGCACTGG	CAACGAGGTCAATGTCACCG	131 pb
<i>Farpau</i> ALF-E	TGCTACGTGAATCGCAGTCC	CGCTTCTCTCCGACAATG	100 pb
<i>Farpau</i> ALF-F	GAGTGCACGTACTTCGTTAC	GTAGTCTTCGACCGTCTTCG	147 pb
<i>CrusFpau</i>	CGAACCAGAGACACCTGTTG	CAGCACACTTGTAGTCGTTG	113 pb
Crustin-like <i>Fpau</i>	CAGGATAAAGACAAGGCCGG	CACATGCAGGCTTATCCCTGAG	422 pb
<i>Fpau</i> -Stylicin1	CACAAGAGTGCCACCGTG	CACACAGGCTGCCGACATAA	151 pb
<i>Fpau</i> -Stylicin2	CACAATCGTGCCACCGTG	CACACAGGCTGCGGACATTC	145 pb

4.8 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO PELO MÉTODO DE SANGER

Para aumentar a sensibilidade do sequenciamento, foi realizada uma PCR inicial utilizando-se os plasmídeos purificados. As reações foram realizadas em um volume final de 15 μ L contendo 0,4 mM de dNTPs, 1 \times tampão de amplificação (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,6 mM de MgCl₂, 0,1% Triton X-100, pH 8,8), 0,4 μ M dos iniciadores M13-F (5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3') e M13-R (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'), 1 U da

enzima *Taq* DNA polymerase (Sinapse) e 1 ng de plasmídeo. As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 10 s, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 s, hibridização a 56°C por 5 s e extensão a 60°C por 4 min. Os produtos de amplificação foram analisados em géis de agarose (1,5%) corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Os produtos amplificados foram purificados com as enzimas Exo (*exonuclease*) e SAP (*shrimp alkaline phosphatase*). Para isso, as amostras foram incubadas a 37°C por 60 min e as enzimas inativadas por calor a 75°C por 15 min. Após análise em gel de agarose (1,5%), os produtos de amplificação purificados foram submetidos a reações de sequenciamento contendo 1 µL do reagente BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Thermo Fisher Scientific), 1,5 µL do tampão 5 × Sequencing Buffer, 0,5 µM do iniciador M13-F ou M13-R e 6,5 µL do produto de PCR purificado. Os produtos foram sequenciados em triplicata (dois sequenciamentos utilizando o iniciador M13-F e um utilizando o iniciador M13-R). As reações de sequenciamento aconteceram nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 10 s, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 s, hibridização a 56°C por 5 s e extensão a 60°C por 4 min. Após o término da reação, as amostras foram precipitadas com etanol absoluto (2:1) e aplicadas no sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (UFSC/CCB/LAMEB).

4.9 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências nucleotídicas obtidas por sequenciamento foram submetidas a uma avaliação de qualidade pelo método Phred/Phrap e alinhadas utilizando o programa CodonCode Aligner (<https://www.codoncode.com/aligner/>). Para a obtenção das sequências aminoacídicas deduzidas foi utilizado o programa ExPASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>). Para a predição do peptídeo sinal foi utilizado o programa SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). A determinação dos parâmetros bioquímicos (massa molecular e ponto isoelétrico teórico) foi feita utilizando-se o programa ExPASy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>). Os alinhamentos das sequências foram gerados a partir do programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Após o alinhamento, as sequências aminoacídicas foram utilizadas para a construção de árvores de filogenéticas utilizando-se o programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018) utilizando o método estatístico Neighbor-Joining, com 1.000 replicatas. Os modelos tridimensionais (3D) foram gerados com a ferramenta SWISS-

MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) a partir do alinhamento com a sequência de *Litset* PEN4-1 do camarão *L. setiferus* (PDB: 1XV3; CUTHBERTSON *et al.*, 2005) para as sequências de peneidinas e alinhamento com a sequência de ALFPm3 do camarão *P. monodon* (PDB: 2JOB; YANG *et al.*, 2009) para as sequências de ALFs. 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.

4.10 ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA

4.10.1 Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real

As análises de expressão gênica foram realizadas pela técnica de Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) utilizando o sistema StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As reações foram executadas em duplicata em um volume final de 15 μ L contendo 1 μ L de cDNA, 0,3 μ M de cada iniciador (**Tabela 1**) e 7,5 μ L de SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2 \times (Thermo Fisher Scientific). Para a amplificação, foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e hibridização/extensão a 60°C por 1 min. A especificidade das reações foi confirmada pela análise de curvas de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s), realizada após as etapas de amplificação. As eficiências dos iniciadores utilizados foram previamente determinadas por trabalhos realizados em nosso grupo (ROSA *et al.*, 2013; GONCALVES *et al.*, 2014; BARRETO *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2018; FARIAS *et al.*, 2019).

4.10.2 Seleção dos genes de referência

Para a escolha do melhor gene de referência, foi avaliada a expressão de quatro genes candidatos (FARIAS *et al.*, 2019): fator de alongação 1 α (EF1 α ; GenBank: GU136229), das proteínas ribossomais 40S *ribosomal protein* S6 (RpS6; GenBank: FE080516) e S3A (RpS3A; GenBank: BF023924) e da β -actina (GenBank: AF30070). A melhor condição de referência foi determinada pelo programa RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>). Para isso, os níveis de expressão dos genes

candidatos foram avaliados de forma individual e, para uma análise mais apurada, também foi considerada a média geométrica dos valores de Cq de suas diferentes combinações (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

4.10.3 Cálculo de expressão gênica relativa e análise estatística

Os valores de expressão gênica relativa foram calculados com base nos valores de Cq dos genes de interesse em relação aos valores de Cq da referência ($\Delta Cq = Cq$ do gene alvo subtraído do Cq da referência). Os níveis de expressão foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), utilizando o Grupo Naïve como condição calibradora. Os dados de RT-qPCR foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey. As análises estatísticas e a construção dos gráficos de expressão gênica relativa foram realizadas no programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas quando as variações de expressão gênica se mostraram superiores a 1,5 vezes (*fold-change*) e o $P < 0,05$. As análises e a nomenclatura utilizadas foram baseadas nas recomendações do MIQE guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a presença de 13 AMPs, pertencentes às quatro famílias atualmente conhecidas, foi confirmada em quatro espécies de camarões-rosa do gênero *Farfantepenaeus* e os seus perfis de expressão gênica avaliados em animais experimentalmente infectados com o fungo patogênico *Fusarium solani*. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) representam a primeira e uma das mais importantes linhas de defesa de camarões peneídeos. Além de atuarem de forma direta contra diferentes classes de microrganismos, os AMPs de camarões participam ainda da regulação da resposta imune, em processos homeostáticos e no controle da microbiota (ROSA & BARRACCO, 2010). Em especial, todas as quatro famílias de AMPs de camarões peneídeos (peneidinas, fatores anti-lipopolissacarídeos, crustinas e stylicinas) são compostas por diferentes membros que apresentam características estruturais, transcricionais e funcionais distintas (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). Esse repertório de efetores antimicrobianos tem conferido, ao longo dos milhares de anos, uma vantagem evolutiva a esses animais que foram capazes de colonizar a quase totalidade dos ambientes costeiros do planeta.

Devido ao seu grande valor comercial, os camarões peneídeos são os crustáceos mais cultivados no mundo. No entanto, perturbações ambientais e outros fatores estressantes podem levar ao comprometimento do estado de saúde desses animais, abrindo uma frente para que patógenos oportunistas se disseminem e causem infecções. Efetivamente, considera-se que as enfermidades sejam o principal fator limitante ao sucesso e sustentabilidade dos sistemas de cultivo em todo o mundo, causando perdas econômicas severas. Nesse contexto, muitos estudos têm sido dedicados para a compreensão dos mecanismos de defesa envolvidos na sobrevivência de espécies cultivadas (gêneros *Litopenaeus*, *Penaeus*, *Fenneropenaeus* e *Marsupenaeus*) a doenças infecciosas de alto impacto, como as de origem viral e bacteriana. Pouco, no entanto, se conhece a respeito da presença e diversidade de AMPs em outros grupos de camarões e a sua função frente a infecções oportunistas, como as causadas por fungos.

5.1 IDENTIFICAÇÃO DE AMPs EM CAMARÕES-ROSA DO GÊNERO *Farfantepenaeus*

A identificação de AMPs em camarões do gênero *Farfantepenaeus* foi realizada por meio de buscas em bancos de dados públicos anotados (GenBank Nucleotide Collection nr/nt)

e não anotados (EST, TSA e WGS) pela ferramenta tBLASTx do NCBI. Nessas buscas, foi investigada a presença dos diferentes membros das quatro famílias clássicas de camarões, além de novos membros que, por ventura, ainda não foram descritos. As sequências não encontradas nas análises *in silico* foram investigadas por métodos moleculares complementares: amplificação por RT-PCR (cDNA de hemócitos da espécie *F. paulensis*), seguido de clonagem molecular e sequenciamento nucleotídico.

5.1.1 Identificação e caracterização de peneidinas (PEN)

Para a identificação de peneidinas (PEN), foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) representantes dos quatro subgrupos da subfamília I (PEN1/2, PEN3, PEN4 e PEN5) e o membro *MjPen-II* da subfamília II. As buscas em bancos de dados anotados resultaram na identificação de uma sequência em *F. brasiliensis* (GenBank: EF450745) e outra em *F. subtilis* (GenBank: EF450742), além das duas sequências previamente publicadas de *F. paulensis* (GenBank: AY956416; AY956417) (BARRACCO *et al.*, 2005). Em bancos de dados não anotados (TSA), foi identificada uma sequência em *F. aztecus* (GenBank: GEUA01018693). Todas as cinco sequências obtidas correspondem ao subgrupo PEN1/2 e nenhuma sequência referente aos demais subgrupos (PEN3, PEN4 e PEN5 da subfamília I, assim como homólogos de *MjPEN-II* da subfamília II) foi identificada em camarões desse gênero. Enquanto que o subgrupo PEN4 foi descrito apenas em camarões do gênero *Litopenaeus*, o subgrupo PEN5 parece ser exclusivo de camarões asiáticos (gêneros *Fenneropenaeus* e *Penaeus*) (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). Interessantemente, não foram descritos membros do subgrupo PEN1/2 em camarões asiáticos (TASSANAKAJON *et al.*, 2017), assim como membros do subgrupo PEN3 em camarões-rosa do gênero *Farfantepenaeus* (BARRACCO *et al.*, 2005).

Apesar da sua ausência em camarões gênero *Farfantepenaeus*, PEN3 é o subgrupo mais expresso nos hemócitos (OLEARY & GROSS, 2006) e o mais amplamente distribuído entre os camarões (ROSA & BARRACO, 2010). Como não foi encontrado nenhum correspondente de PEN3 e PEN4, a presença desses subgrupos de camarões ocidentais foi investigada em amostras de cDNA de hemócitos de *F. paulensis* pela técnica de RT-PCR. Para isso, foram utilizados pares de iniciadores baseados em regiões consenso das sequências de PEN3 e PEN4 de espécies do gênero *Litopenaeus* (filogeneticamente mais próximas do gênero *Farfantepenaeus*). Apenas os iniciadores referentes a PEN4 amplificaram um produto de tamanho esperado (243 pb). Mesmo após diferentes tentativas e padronizações, não houve

amplificação de PEN3 nas amostras de hemócitos de *F. paulensis*. O produto de tamanho esperado foi clonado, sequenciado e a sua sequência nucleotídica confrontada com bancos de dados. A sequência obtida apresentou alta similaridade (>83%) com sequências do subgrupo PEN4. Esse novo AMP foi então classificado como uma peneidina do subgrupo 4 de *F. paulensis* (*Farpau* PEN4, segundo nomenclatura proposta por GUEGUEN *et al.*, 2006) e depositada no GenBank com o número de acesso MN510326. (**Figura 12**).

Figura 12. Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida de *Farpau* PEN4.

atg	cgc	ctc	gtg	gtc	tgc	ctg	gtc	ttc	ctg	gcc	tcc	ttc	gcc	ctg	gtc	tgc	caa	ggg	cac
M	R	L	V	V	C	L	V	F	L	A	S	F	A	L	V	C	Q	G	H
agc	agt	ggt	ttc	gcg	cgg	cca	tta	ccg	aaa	cca	tcc	att	ggg	aca	cct	att	ttt	cct	agg
S	S	G	F	A	R	P	L	P	K	P	S	I	G	T	P	I	F	P	R
ccg	att	ggt	tgc	gat	gta	tgc	cgc	gga	att	tcc	tcc	tca	aca	gct	cga	ctt	tgc	tgc	ttc
P	I	G	C	D	V	C	R	G	I	S	S	S	T	A	R	L	C	C	F
agg	tac	ggg	gac	tgt	tgt	cat	tta	gga	taa										
R	Y	G	D	C	C	H	L	G	-										

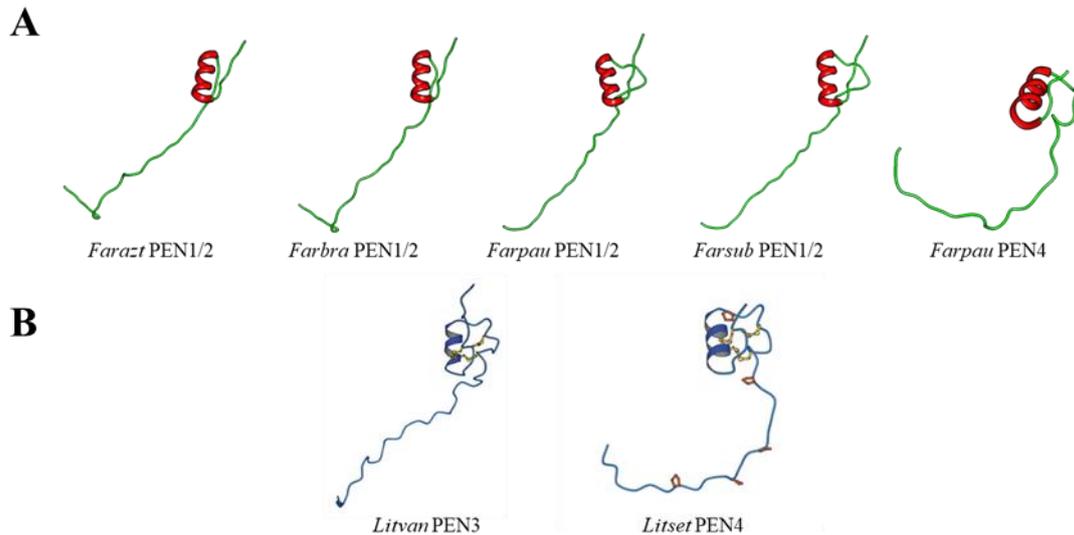
O peptídeo sinal encontra-se sublinhado e em negrito. O hífen (-) indica o códon de parada.

A sequência de *Farpau* PEN4 codifica um precursor contendo um peptídeo sinal de 19 resíduos aminoacídicos, seguido de um peptídeo maduro catiônico ($pI = 8,96$) de 5,33 kDa. Assim como os demais subgrupos de PEN, *Farpau* PEN4 apresenta uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e arginina e uma região C-terminal contendo seis resíduos conservados de cisteína (**Figura 12**). As propriedades bioquímicas dos subgrupos PEN1/2 e PEN4 de camarões-rosa estão apresentadas na **Tabela 2**. Modelos tridimensionais baseados na estrutura de *Litset* PEN4 (PDB: 1XV3) mostraram que as peneidinas possuem uma estrutura conservada (**Figura 13**), composta por uma região N-terminal linear, seguida por uma α -hélice anfipática na região C-terminal (YANG *et al.*, 2003; CUTHBERTSON *et al.*, 2005).

Tabela 2. Propriedades bioquímicas das peneidinas de camarões do gênero *Farfantepenaeus*.

Espécie	GenBank	Identificação	Nº resíduos	MM	pI
PEN1/2					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01018693	TSA Project (não anotado)	52	5,76	9,50
<i>F. brasiliensis</i>	EF450745	Nucleotide collection (nr/nt)	52	5,89	9,81
<i>F. paulensis</i>	AY956416	BARRACCO <i>et al.</i> , 2005	52	5,84	9,69
	AY956417	BARRACCO <i>et al.</i> , 2005	52	5,74	9,50
<i>F. subtilis</i>	EF450742	Nucleotide collection (nr/nt)	52	5,92	9,63
PEN4					
<i>F. paulensis</i>	MN510326	Clonagem molecular	50	5,33	8,96

MM: massa molecular predita em kDa. pI: ponto isoelétrico teórico. Valores catiônicos de pI estão destacados na cor azul.

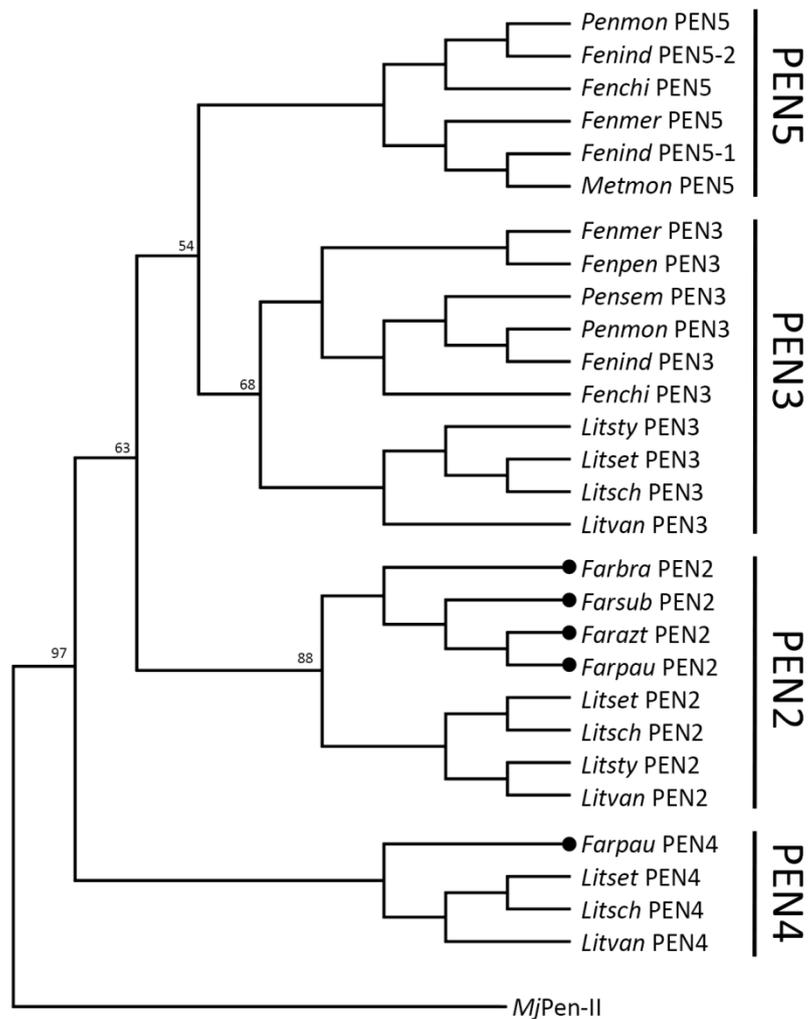
Figura 13. Modelos tridimensionais (3D) de sequências representativas das peneidinas de *Litopenaeus vannamei* e de *Farfantepenaeus*.

Representação da estrutura terciária das peneidinas (**A**) de camarões do gênero *Farfantepenaeus* e (**B**) das peneidinas *Litvan* PEN3 de *Litopenaeus vannamei* (PDB: 1UEO) e *Litset* PEN4 de *Litopenaeus setiferus* (PDB: 1XV3).

As sequências aminoacídicas deduzidas de PEN1/2 e PEN4 de camarões-rosa foram alinhadas e comparadas com outros subgrupos de PEN de diferentes espécies (**Figura 14**). As sequências de PEN1/2 das quatro espécies de *Farfantepenaeus* mostraram uma identidade de 73-88% entre si e de 51-68% com as sequências de PEN1/2 de camarões do gênero *Litopenaeus*. Interessantemente, as PEN1/2 de camarões do gênero *Farfantepenaeus* possuem um resíduo aminoacídico a mais que as PEN1/2 de espécies do gênero *Litopenaeus* (um resíduo de glutamina ou isoleucina ou prolina na posição 17 do peptídeo maduro). Comparativamente, a PEN4 de *F. paulensis* (*Farpau* PEN4) possui dois resíduos

resultados sugerem que os genes PEN1/2 e PEN4 surgiram num ancestral comum aos camarões dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus* (**Figura 15**).

Figura 15. Representação gráfica, na forma de cladograma, das relações entre as sequências das duas subfamílias de peneidinas.



O cladograma foi construído utilizando o método de Neighbor-Joining (1.000 réplicas) no programa MEGA X. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós. Os pontos representam os AMPs encontrados em camarões do gênero *Farfantepenaeus*. Os números de acesso (GenBank) estão apresentados no Apêndice A.

A partir das metodologias utilizadas neste estudo, não foram encontradas sequências de PEN3 em camarões do gênero *Farfantepenaeus*. Como anteriormente mencionado, esse é o subgrupo mais abundantemente expresso nos hemócitos de camarões (OLEARY & GROSS, 2006), além de parecer ser o gene mais ancestral (TASSANAKAJON *et al.*, 2018). Tais resultados podem estar relacionados a limitações metodológicas, como a especificidade dos iniciadores utilizados, as padronizações das reações de RT-PCR, entre outros.

Caso PEN3 realmente não exista em camarões do gênero *Farfantepenaeus*, como sugerido por BARRACO e colaboradores (2005), é provável que esse gene tenha sido perdido durante os eventos de especiação dos camarões-rosa. Até o momento, nenhum subgrupo da subfamília I (PEN1/2 a PEN5) foi identificado em camarões do gênero *Marsupenaeus* (AN *et al.*, 2016) e a falta de um gene PEN comum a todos os camarões ainda levanta muitas discussões a respeito da história filogenética dessa importante família de AMPs (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). Independente do real repertório de peneidinas encontrado em camarões-rosa, o seu espectro de atividade antimicrobiana ainda continua desconhecido. Além disso, estudos funcionais comparativos (via RNA de interferência) precisam ser ainda realizados para determinar o impacto da presença/ausência de determinados subgrupos de PEN nas diferentes espécies de camarões peneídeos. Finalmente, por se tratarem de espécies ocidentais, não foi investigada, neste estudo, a presença de peneidinas exclusivas de camarões asiáticos (PEN5 e *Mj*Pen-II). Assim, não pode ser excluída a hipótese da presença desses ortólogos em camarões-rosa.

Por se tratar um gene exclusivamente expresso nos hemócitos (DESTOUMIEUX *et al.*, 2000a), os resultados das buscas *in silico* no transcrito de hepatopâncreas da espécie *F. aztecus* (GenBank: GEUA00000000) pode não ter revelado a real diversidade dessa família de AMPs em camarões-rosa. O sequenciamento do transcrito hemocitário de espécies de *Farfantepenaeus* poderá completar os resultados obtidos neste estudo e revelar a real diversidade de peneidinas em camarões-rosa.

5.1.2 Identificação e caracterização de fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)

Para a identificação de ALFs, foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) representantes dos sete membros dessa família: ALF-A a ALF-G. As buscas em bancos de dados anotados resultaram na identificação de uma sequência previamente publicada de *F. paulensis* (GenBank: EF601051) (ROSA *et al.*, 2008). Em bancos de dados não anotados (TSA), foram identificadas sete sequências em *F. aztecus* (GenBank: GEUA01066862; GEUA01068264; GEUA01066953; GEUA01067287; GEUA01004511; GEUA01070429; GEUA01069818) (**Tabela 3**). A sequência obtida de *F. paulensis* (ROSA *et al.*, 2008) corresponde ao Grupo ALF-B. Membros dos sete Grupos foram identificados em *F. aztecus*.

Não foram encontradas duplicações do gene ALF-C, assim como descrito em camarões asiáticos (MATOS *et al.*, 2018).

Tabela 3. Propriedades bioquímicas dos ALFs de camarões do gênero *Farfantepenaeus*.

Espécie	GenBank	Identificação	Nº resíduos	MM	pI
ALF-A					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01066862	TSA Project (não anotado)	98	11,48	6,45
ALF-B					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01068264	TSA Project (não anotado)	98	11,23	10,08
<i>F. paulensis</i>	EF601051	ROSA <i>et al.</i> , 2008	98	11,19	10,17
ALF-C					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01066953	TSA Project (não anotado)	98	11,06	9,50
ALF-D					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01067287	TSA Project (não anotado)	98	10,82	5,60
ALF-E					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01004511	TSA Project (não anotado)	99	11,17	5,63
ALF-F					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01070429	TSA Project (não anotado)	98	11,15	9,47
ALF-G					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01069818	TSA Project (não anotado)	105	11,94	5,86

MM: massa molecular predita em kDa. pI: ponto isoelétrico teórico. Valores catiônicos e aniônicos de pI estão destacados nas cores azul e vermelho, respectivamente.

As sequências aminoacídicas deduzidas dos ALFs de camarões-rosa foram alinhadas e comparadas com ALFs de diferentes espécies (**Figura 16**). As sequências de ALF-B das duas espécies de *Farfantepenaeus* mostraram uma similaridade de 95% entre si. As sequências dos setes Grupos de ALFs de *Farfantepenaeus* apresentaram uma identidade de 85-97% com as sequências de seus respectivos Grupos em *Litopenaeus*. Comparativamente, os ALFs de camarões do gênero *Farfantepenaeus* possuem sua composição aminoacídica muito semelhante aos ALFs das espécies do gênero *Litopenaeus* (**Figura 16**).

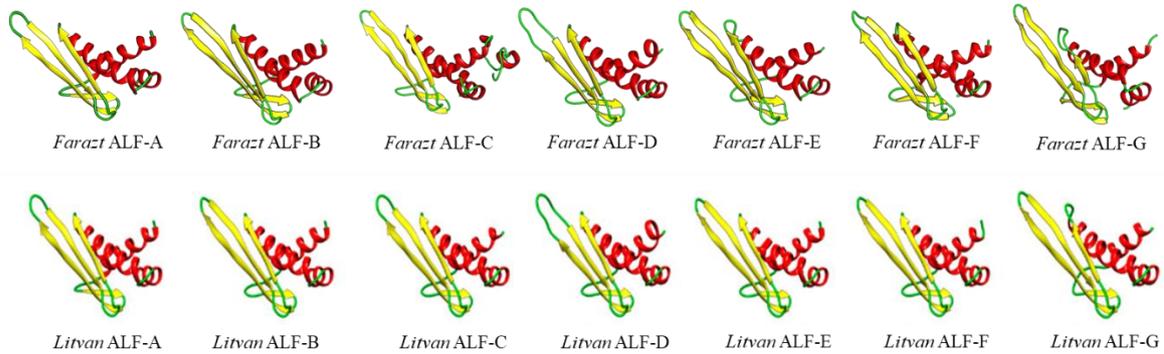
Figura 16. Alinhamento das seqüências aminoacídicas dos sete Grupos de ALFs.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
<i>Farazt</i> ALF-A	----	QGVQDLIPSLVDRI	VGLWHSDEVEFMGHS	CRYSQRPSFYRWEL	YFNGRMM	PGWAPFTGRSRTSR	SP-SGAVEHATRD	FVQKALQSNLI	TEDDARIWLEH	----	
<i>Litvan</i> ALF-A	----	QGVQDLIPSLVQKI	VGLWHSDEVEFMGHS	CRYSQRPSFYRWEL	YFNGRMM	PGWAPFTGRSRTSR	SP-SGAVEHATRD	FVQKALQSNLI	TEDDARIWLEH	----	
ALFPm2	----	QGVQDLLPALVEKI	AGLWHSDEVEFLGHS	CRYSQRPSFYRWEL	YFNGRMM	PGWAPFTGRSRTSR	SP-SGAVEHATRD	FVQKALQSNLI	TEDDARIWLEH	----	
FcALF4	----	QGVQDLLPALVDRI	VGLWHSDEVEFMGHS	CRYSQRPSFYRWEL	YFNGRMM	PGWAPFTGRSRTSR	SP-SGAVEHATRD	FVQKALQSNLI	TEDDARIWLEH	----	
<i>Fenpen</i> ALF-A	----	QGVQDLLPALVERI	VGLWHSDEVEFMGHS	CRYSQRPSFYRWEL	YFNGRMM	PGWAPFTGRSRTSR	SP-SGAVEHATRD	FVQKALQSNLI	TEDDARIWLEH	----	
MjALF-A1	----	QGVQDLIPALVQRI	VGLWHSDEVEFMGHS	CRYSQRPTFYRWEL	YFRGSM	PGWAPFTGRSMTSR	SP-SGAVEHATRD	FVEKALQRNLI	TEDDARIWLEH	----	
<i>Farazt</i> ALF-B	----	QGWAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPIRGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
<i>Farpa</i> ALF-B	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPIRGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
<i>Litvan</i> ALF-B	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPIRGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
<i>Litsch</i> ALF-B	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPITGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
<i>Litsty</i> ALF-B	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPITGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
<i>Fenpen</i> ALF-B	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPITGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
<i>Fenind</i> ALF-B	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPITGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
ALFPm3	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPITGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
MjALF-B	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPITGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
<i>Farazt</i> ALF-C	----	SGWEALVPAIANKL	TGLWESGELELLGHY	CSFNVTPKFKRWQ	LYYKGRMM	PGWTAITGQAE	TRSR-SGVVGR	TQDFVRFKAFS	AGLITSEEARVW	LNNS	
<i>Litvan</i> ALF-C	----	SGWEALVPAIANKL	TGLWESGELELLGHY	CSFNVTPKFKRWQ	LYYKGRMM	PGWTAIRGQAE	TRSR-SGVVGR	TQDFVRFKAFS	AGLITSEEARVW	LNNS	
<i>Fenpen</i> ALF-C	----	SGWEALVPAIADKL	TGLWESGELELLGHY	CSFNVTPKFKRWQ	LYYKGRMM	PGWTAIRGQAE	TRSR-SGVVGR	TQDFVRFKAFS	AGLITSEEARVW	LNNS	
FcALF2	----	SGWEALVPAIADKL	TGLWESGELELLGHY	CSFNVTPKFKRWQ	LYYKGRMM	PGWTAIRGQAE	TRSR-SGVVGR	TQDFVRFKAFS	AGLITSEEARVW	LNNS	
ALFPm6	----	SGWEALVPAIANKL	TSWESGEFELLGHY	CSFNVTPKFKRWQ	LYYKGRMM	PGWTAIRGQAE	TRSR-SGVVGR	TQDFVRFKAFS	AGLITSEEARVW	LNNS	
MjALF-C1	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPITGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
MjALF-C2	----	QGWQAVAAAASVSKI	VGLWRNEETELLGHK	CRFTVKPYIKRIQL	LYYKGRMM	PGWTPITGEARTSR	SH-SGVAGRTARD	FVQKAFRDGLI	SEQDAKRWLNS	----	
FcALF3	----	ADWGAFMPSIATRL	TGLWETGELELLGHY	CSVSVKPTFQWQ	LYYKGRMM	PGWTPIRGVAE	TRSR-SGVVGR	TQDFVRFKAFS	AGLITSEEARVW	LNNS	
ALFPm7	----	ADWGAFMPSIATRL	TGLWETGELELLGHY	CSVSVKPTFQWQ	LYYKGRMM	PGWTPIRGVAE	TRSR-SGVVGR	TQDFVRFKAFS	AGLITSEEARVW	LNNS	
<i>Farazt</i> ALF-D	---	FSLKDLFVFPVIKE	QVSDLRWTKGDI	DLVGHSC	TYNVKPDIDGFE	LYYKGRMM	PGWTLRGS	ENRTRSK-SGVVNA	AVKDFIQKAL	KQGLVTEEEAKPHLV	
<i>Litvan</i> ALF-D	---	FSLKDLFVFPVIKE	QVSDLRWTKGDI	DLVGHSC	TYNVKPDIDGFE	LYYKGRMM	PGWTLRGS	ENRTRSK-SGVVNA	AVKDFIQKAL	KQGLVTEEEAKPHLV	
<i>Litsty</i> ALF-D	---	FSLKDLFVFPVIKE	QVSDLRWTKGDI	DLVGHSC	TYNVKPDIDGFE	LYYKGRMM	PGWTLRGS	ENRTRSK-SGVVNA	AVKDFIQKAL	KQGLVTEEEAKPHLV	
<i>Fenpen</i> ALF-D	---	FGLKDLILPAVTTQ	VKDLWRNGD	VLDVHSC	SYSVKPDIDGFE	LYYKGRMM	PGWTLRGS	ENRTRSK-SGVVNA	AVKDFIQKAL	KQGLVTEEEAKPHLV	
FcALF6	---	FGLKDLILPAVTTQ	VKDLWRNGD	VLDVHSC	SYSVKPDIDGFE	LYYKGRMM	PGWTLRGS	ENRTRSK-SGVVNA	AVKDFIQKAL	KQGLVTEEEAKPHLV	
ALFPm8	---	FGLKDLILPAVTTQ	VKDLWRNGD	VLDVHSC	SYSVKPDIDGFE	LYYKGRMM	PGWTLRGS	ENRTRSK-SGVVNA	AVKDFIQKAL	KQGLVTEEEAKPHLV	
MjALF-D	---	QGLKDLFLPVI	SQIAGLWRTG	TVLDDHLCT	TYNVKPDIDGFE	LYYKGRMM	PGWTLRGS	ENRTRSK-SGVVNA	AVKDFIQKAL	KQGLVTEEEAKPHLV	
<i>Farazt</i> ALF-E	RPQ--	LGDI	GLSVVTTFL	ENAVKTEIT	ILDNYCV	VSRSPLYLKKF	EVHYRAEVK	PGWTTI	IVGRGRDHTNPT	NSSELAIAIKDFV	QAVKQGLVTEEEAKPHLV
<i>Litvan</i> ALF-E	RPQ--	LGDI	GLSVVTTFL	ENAVKTEIT	ILDNYCV	VSRSPLYLKKF	EVHYRAEVK	PGWTTI	IVGRGRDHTNPT	NSSELAIAIKDFV	QAVKQGLVTEEEAKPHLV
FcALF5	RPQ--	LGDI	GLSVVTTFL	ENAVKTEIT	ILDNYCV	VSRSPLYLKKF	EVHYRAEVK	PGWTTI	IVGRGRDHTNPT	NSSELAIAIKDFV	QAVKQGLVTEEEAKPHLV
ALFPm9	RPQ--	LGDI	GLSVVTTFL	ENAVKTEIT	ILDNYCV	VSRSPLYLKKF	EVHYRAEVK	PGWTTI	IVGRGRDHTNPT	NSSELAIAIKDFV	QAVKQGLVTEEEAKPHLV
MjALF-E2	RPQ--	LGDI	GLSVVTTFL	ENAVKTEIT	ILDNYCV	VSRSPLYLKKF	EVHYRAEVK	PGWTTI	IVGRGRDHTNPT	NSSELAIAIKDFV	QAVKQGLVTEEEAKPHLV
<i>Farazt</i> ALF-F	----	QWEALVPLITQ	VVGLWKTGEREL	FGHECT	TYFVTPKVKIS	FELYFKGRMT	PTLSNVRGEAL	TRSR-SGVEAKT	VEDYVKKVAK	GVITTEEDAKAWLNK	
<i>Litvan</i> ALF-F	----	QWETLIPLITQ	VVGLWKTGEREL	FGHECT	TYFVTPKVKIS	FELYFKGRMT	PTLSNVRGEAL	TRSR-SGVEAKT	VEDYVKKVAK	GVITTEEDAKAWLNK	
MjALF-D	----	QWETLIPLITQ	VVGLWKTGEREL	FGHECT	TYFVTPKVKIS	FELYFKGRMT	PTLSNVRGEAL	TRSR-SGVEAKT	VEDYVKKVAK	GVITTEEDAKAWLNK	
<i>Fenpen</i> ALF-F	----	QWETLIPLITQ	VVGLWKTGEREL	FGHECT	TYFVTPKVKIS	FELYFKGRMT	PTLSNVRGEAL	TRSR-SGVEAKT	VEDYVKKVAK	GVITTEEDAKAWLNK	
ALFPm10	----	QWETLIPLITQ	VVGLWKTGEREL	FGHECT	TYFVTPKVKIS	FELYFKGRMT	PTLSNVRGEAL	TRSR-SGVEAKT	VEDYVKKVAK	GVITTEEDAKAWLNK	
FcALF1	----	QWETLIPLITQ	VVGLWKTGEREL	FGHECT	TYFVTPKVKIS	FELYFKGRMT	PTLSNVRGEAL	TRSR-SGVEAKT	VEDYVKKVAK	GVITTEEDAKAWLNK	
<i>Farazt</i> ALF-G	QEMED	QKNHVSDILSN	IFNSLVKDG	EIELLGHYCS	YSYTRPYFIR	WLKFKSKVMM	PGWTLVYGS	ASESSVNSIQNAI	INFINFKAYQ	QEGVITTEEDAKAWLNK	
<i>Litvan</i> ALF-G	QEMED	QKNHVSDILSN	IFNSLVKDG	EIELLGHYCS	YSYTRPYFIR	WLKFKSKVMM	PGWTLVYGS	ASESSVNSIQNAI	INFINFKAYQ	QEGVITTEEDAKAWLNK	
ALFPm11	QEMEE	QKNHVSDILSN	IFNSLVKDG	EIELLGHYCS	YSYTRPYFIR	WLKFKSKVMM	PGWTLVYGS	ASESSVNSIQNAI	INFINFKAYQ	QEGVITTEEDAKAWLNK	
MjALF-A2	QEVES	RDLELPEIL	LGKFFDVL	VRDGEI	EIELLGHYCS	YGTFRHLIR	WLKFKSKVMM	PGWTLVYGS	ASESSVNSIQNAI	INFINFKAYQ	QEGVITTEEDAKAWLNK
FcALF8	QEVEE	QKNHVSDILSN	IFNSLVKDG	EIELLGHYCS	YSYTRPYFIR	WLKFKSKVMM	PGWTLVYGS	ASESSVNSIQNAI	INFINFKAYQ	QEGVITTEEDAKAWLNK	

A régua acima das seqüências indica as posições dos resíduos de aminoácidos do peptídeo maduro. Os dois resíduos conservados de cisteína estão destacados em preto. Os hifens (-) indicam *gaps*. Os números de acesso (GenBank) estão apresentados no Apêndice B.

Foram gerados modelos da estrutura 3D dos sete Grupos de ALFs de *Farfantepenaeus* e comparados com os modelos de *L. vannamei* (Figura 17). Todos os modelos apresentaram uma estrutura conservada contendo 3 α -hélices e 4 folhas- β , mesma estrutura observada por HOESS *et al.* (1993) e YANG *et al.* (2009).

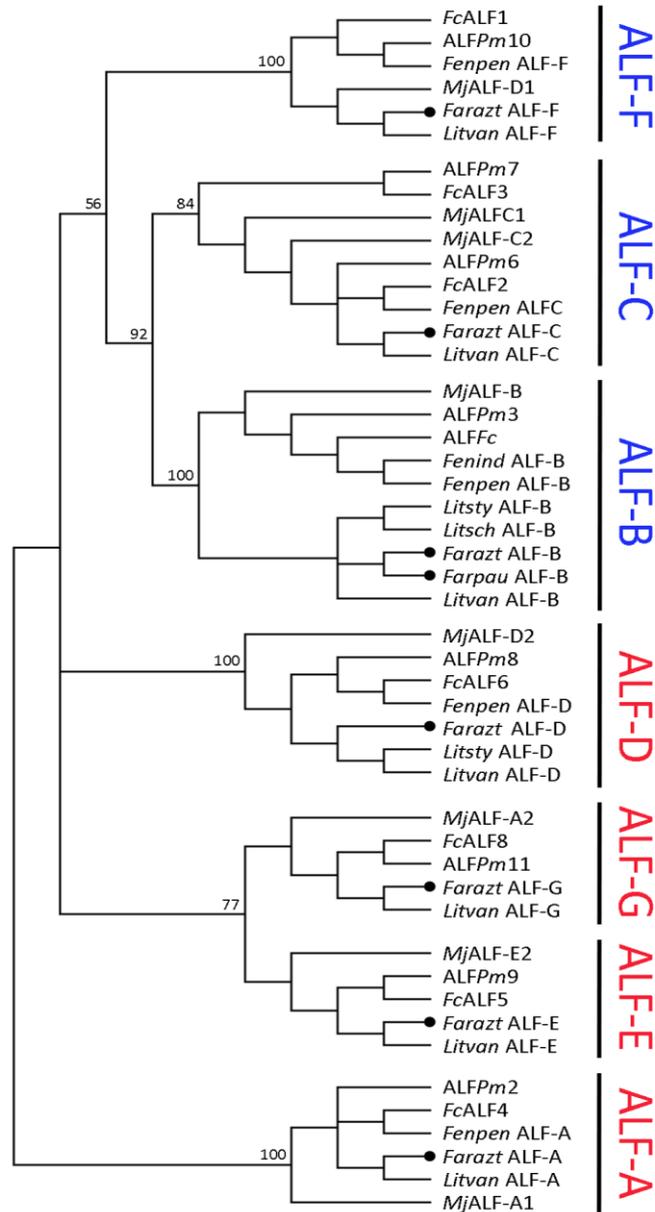
Figura 17. Modelos tridimensionais (3D) de sequências representativas dos sete Grupos de ALFs de *Farfantepenaeus aztecus* e *Litopenaeus vannamei*.



Para a análise filogenética, foi feita a reconstrução filogenética com as sequências aminoacídicas dos peptídeos maduros, utilizando o método de Neighbor-Joining (**Figura 18**). A partir da reconstrução filogenética realizada, fica evidente a presença dos sete membros de ALFs em *Farfantepenaeus*, assim como é possível observar que os Grupos catiônicos se agruparam juntos, estando relacionados entre si (ALF-B, C e F). Em todos os Grupos, os ALFs de *Farfantepenaeus* formaram um clado junto dos ALFs dos camarões do gênero *Litopenaeus*. Tais resultados são similares ao encontrado nas peneidinas, sugerindo a presença de um ancestral comum entre as duas espécies.

Assim como em outras espécies, membros dos sete Grupos de ALFs também foram encontrados em camarões do gênero *Farfantepenaeus*. Essa alta diversidade de ALFs assegura um repertório mais amplo de moléculas antimicrobianas, garantindo um maior potencial defensivo em camarões peneídeos. Como sugerido por SCHMITT e colaboradores (2016), essa diversidade pode ser graças a forte pressão evolutiva na relação patógeno-hospedeiro, aumentando a diversidade genética de genes envolvidos no sistema imune.

Figura 18. Representação gráfica, na forma de cladograma, das relações entre as sequências dos ALFs de camarões peneídeos.



O cladograma foi construído utilizando o método de Neighbor-Joining (1.000 réplicas) no programa MEGA X. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós. Os pontos representam os AMPs encontrados em camarões do gênero *Farfantepenaeus*. Os números de acesso (GenBank) estão apresentados no Apêndice B.

5.1.3 Identificação e caracterização de crustinas (CRUS)

Neste trabalho, restringiu-se à identificação das crustinas do Tipo II em *Farfantepenaeus*, por representarem o Tipo mais abundante em camarões peneídeos. Para a

identificação foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) crustinas dos subtipos IIa e IIb de camarões peneídeos de diferentes espécies. As buscas em bancos de dados anotados resultaram na identificação de três sequências previamente publicadas: *F. paulensis* (GenBank: EF182747), *F. brasiliensis* (GenBank: EF601055) e *F. subtilis* (GenBank: EF450744) (ROSA *et al.*, 2007). Em bancos de dados não anotados (TSA), foi identificada uma sequência em *F. aztecus* (GenBank: GEUA01009615). Todas as sequências obtidas correspondem ao subtipo IIa. Nenhuma sequência referente ao subtipo IIb foi identificada em camarões do gênero *Farfantepenaeus*.

Como não foi encontrado nenhum correspondente do subtipo IIb, a presença desse subtipo foi investigada em amostras de cDNA de hemócitos de *F. paulensis* pela técnica de RT-PCR. Para isso, foram utilizados pares de iniciadores baseados na sequência da crustina do subtipo IIb de *L. vannamei* (BARRETO *et al.*, 2018), posicionados na sequência do peptídeo maduro. Foi obtido um produto de tamanho esperado (422 pb), correspondente a uma CDS incompleta, que possui apenas o peptídeo maduro (sem o peptídeo sinal). O produto foi clonado, sequenciado e a sua sequência nucleotídica confrontada com bancos de dados. Esse novo AMP foi então classificado como uma crustina do subtipo IIb de *F. paulensis* (Crustin-like *Fpau*) e depositada no GenBank com o número de acesso MN510327. (**Figura 19**).

Figura 19. Sequências nucleotídica e aminoácídica deduzida de Crustin-like *Fpau*.

Sequência parcial (sem o peptídeo sinal). O hífen (-) indica o códon de parada.

cag	gat	aaa	gac	aag	gcc	ggc	act	cgc	ttc	ctt	ggc	ggc	caa	gga	ggt	gga	ttg	att	cgg
Q	D	K	D	K	A	G	T	R	F	L	G	G	Q	G	G	G	L	I	P
ggg	ggt	cct	ggg	cac	ggt	ggc	agc	ttc	cct	gga	gcc	ggt	ggc	aac	ttc	cct	gta	ggc	ggt
G	V	P	G	H	G	G	S	F	P	G	A	G	G	N	F	P	V	G	G
ggc	aac	ttt	cct	gta	ggc	ggt	ggc	atc	ttc	cct	gga	gcc	ggt	ggc	atc	ttt	cct	gga	acc
G	N	F	P	V	G	G	G	I	F	P	G	A	G	G	I	F	P	G	T
ggt	ggc	atc	cag	cct	gga	ggt	gga	ttc	aac	tgc	aat	tac	tgc	aga	acg	ccc	gtc	ggg	tac
G	G	I	Q	P	G	G	G	F	N	C	N	Y	C	R	T	P	V	G	Y
gta	tgc	tgc	aag	ccc	ggt	agg	tgt	cca	acc	att	cgt	gac	gcc	tgc	ccg	aac	gtc	cga	aac
V	C	C	K	P	G	R	C	P	T	I	R	D	A	C	P	N	V	R	N
gag	gtc	cca	atc	tgc	cgc	cag	gac	ctg	gac	tgc	ttc	ggc	tcc	gac	aag	tgc	tgc	tac	gac
E	V	P	I	C	R	Q	D	L	D	C	F	G	S	D	K	C	C	Y	D
acc	tgc	ctc	caa	gac	acc	gtc	tgc	aaa	ccc	atc	gtg	gca	gga	tct	cag	gga	taa		
T	C	L	Q	D	T	V	C	K	P	I	V	A	G	S	Q	G	-		

O hífen (-) indica o códon de parada.

A sequência de Crustin-like *Fpau* codifica um peptídeo maduro catiônico ($pI = 7,97$) de 138 aminoácidos (13,87 kDa). Assim como as demais crustinas do subtipo IIb, Crustin-like *Fpau* apresenta uma região rica em glicina contendo três repetições do pentapeptídeo Val-

Phe-Pro-Gly-Ala (VFPGA), seguido de uma região com quatro resíduos conservados de cisteína e do domínio WAP com 8 resíduos conservados de cisteínas (**Figura 19**). As propriedades bioquímicas das crustinas dos subtipos IIa e IIb de camarões-rosa estão apresentadas na **Tabela 4**.

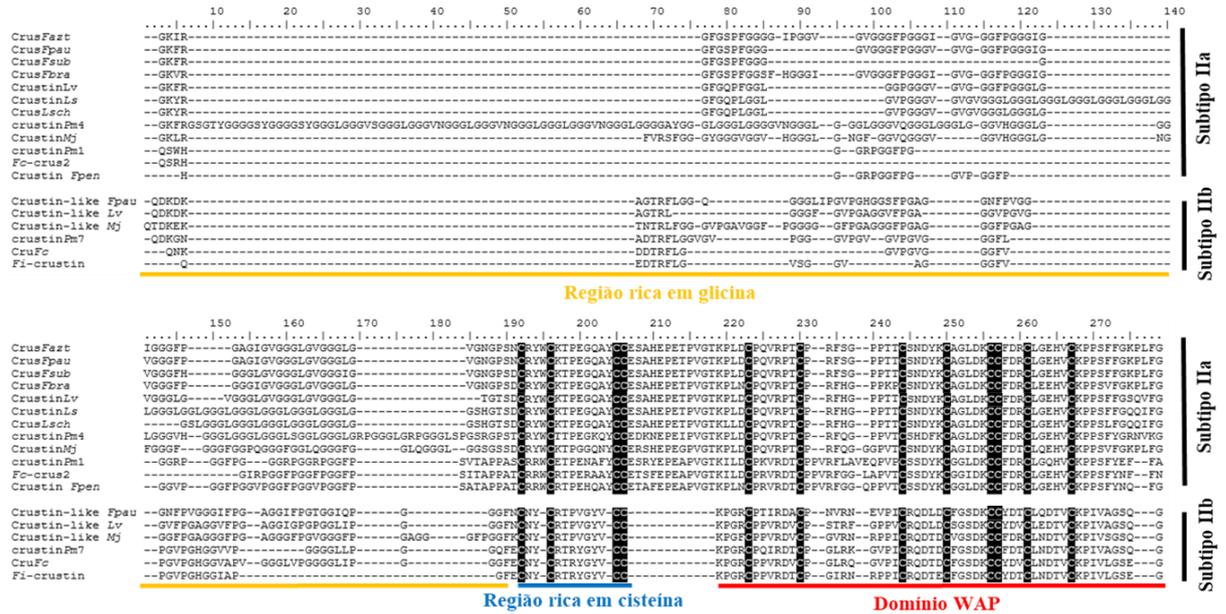
Tabela 4. Propriedades bioquímicas das crustinas de camarões do gênero *Farfantepenaeus*.

Espécie	GenBank	Identificação	Nº resíduos	MM	pI
Tipo IIa					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01009615	TSA Project (não anotado)	156	15,15	8,29
<i>F. paulensis</i>	EF182747	ROSA <i>et al.</i> , 2007	151	14,67	8,29
<i>F. brasiliensis</i>	EF601055	ROSA <i>et al.</i> , 2007	157	15,32	8,29
<i>F. subtilis</i>	EF450744	ROSA <i>et al.</i> , 2007	129	13,00	8,03
Tipo IIb					
<i>F. paulensis</i>	MN510327	Clonagem molecular	138	13,87	7,97

MM: massa molecular predita em kDa. pI: ponto isoelétrico teórico. Valores catiônicos de pI estão destacados na cor azul.

As sequências aminoacídicas deduzidas das diferentes crustinas do Tipo II de camarões-rosa foram alinhadas e comparadas com os de diferentes espécies. As sequências do subtipo IIa das quatro espécies de *Farfantepenaeus* mostraram uma similaridade de 87% entre si e de 75-79% com as sequências do subtipo IIa de camarões do gênero *Litopenaeus*. A sequência obtida do subtipo IIb apresentou alta similaridade (>78%) com a sequência do subtipo IIb de *L. vannamei*. Comparativamente, o subtipo IIa de camarões do gênero *Farfantepenaeus* apresentam o tamanho da sua região rica em glicina diferente entre as espécies. A sequência da crustina do subtipo IIa de *F. subtilis* possui uma região rica em glicina menor que o subtipo IIa de outras espécies de *Farfantepenaeus* e muito semelhante com a região rica em glicina do subtipo IIa de *L. schmitti* (**Figura 20**).

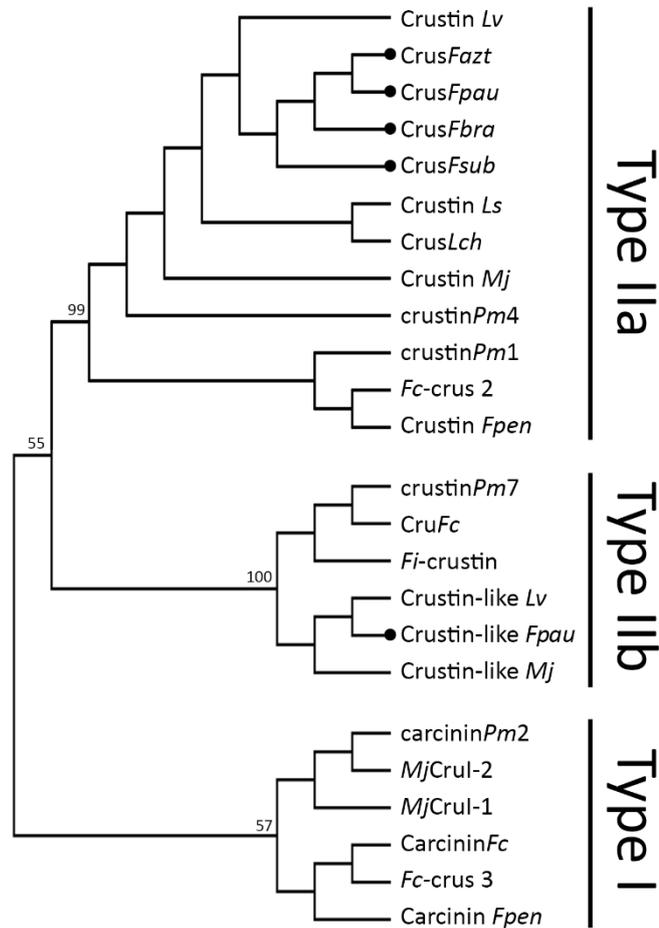
Figura 20. Alinhamento das sequências aminoacídicas das crustinas dos subtipos IIa e IIb.



A régua acima das sequências indica as posições dos resíduos de aminoácidos do peptídeo maduro. Os resíduos conservados de cisteína estão destacados em preto. Os hifens (-) indicam gaps. Os números de acesso (GenBank) estão apresentados no Apêndice C.

Os resultados da representação gráfica (na forma de um cladograma) do alinhamento dos diferentes subtipos de crustinas do Tipo II mostraram a repartição dos subtipos IIa e IIb em dois clados separados (Figura 21). Dentro do clado do subtipo IIa, as crustinas de *Farfantepenaeus* formaram um grupo distinto das crustinas dos camarões do gênero *Litopenaeus*. Entretanto no clado das IIb, a crustina de *F. paulensis* agrupou juntamente a sequência de *L. vannamei*, o qual pode estar relacionado à falta de sequências do subtipo IIb em camarões do gênero *Farfantepenaeus* nos bancos de dados anotados e não-anotados.

Figura 21. Representação gráfica, na forma de cladograma, das relações entre as sequências das crustinas dos Tipos I e II de camarões peneídeos.



O cladograma foi construído utilizando o método de Neighbor-Joining (1.000 réplicas) no programa MEGA X. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós. Os pontos representam os AMPs encontrados em camarões do gênero *Farfantepenaeus*. Os números de acesso (GenBank) estão apresentados no Apêndice C.

Em camarões peneídeos, as crustinas do Tipo II representam o grupo de crustinas hemocitárias de maior predominância. Neste trabalho, foi identificado e caracterizado, pela primeira vez, uma crustina do subtipo IIb em camarões do gênero *Farfantepenaeus*, ilustrando a extensa diversidade de AMPs dessa família. Em *Farfantepenaeus*, as crustinas do subtipo IIa possuem de 4 a 7 resíduos de glicina a mais em sua região rica em glicina, quando comparados com *Litopenaeus*. A presença de uma região hidrofóbica rica em glicinas pode garantir uma maior flexibilidade na estrutura proteica (SMITH *et al.*, 2008), porém não se sabe se essa flexibilidade altera a sua atividade antimicrobiana. Para determinar o espectro de atividade antimicrobiana dessas crustinas é necessário realizar testes de atividade

antimicrobiana *in vitro* ou *in vivo* (via RNA de interferência). Atualmente, há apenas um único estudo funcional que avaliou o envolvimento das crustinas do Tipo Iia de *Litopenaeus* na resposta contra bactérias do gênero *Vibrio* (SHOCKEY *et al.*, 2009).

5.1.4 Identificação e caracterização de stylicinas (STY)

Para a identificação de stylicinas (STY), foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) representantes de STY das espécies *L. stylirostris* (*Lsty*-Stylicin1 e *Lsty*-Stylicin2), *L. vannamei* (*Lvan*-Stylicin1 e *Lvan*-Stylicin2) e *M. japonicus* (*Mjap*-Stylicin). Não foram encontradas sequências codificantes de STY em banco de dados anotados de *Farfantepenaeus*. Em bancos de dados não anotados (TSA), foi identificada uma sequência em *F. aztecus* (GenBank: GEUA01075974). Atualmente, foi descrito que camarões do gênero *Litopenaeus* possuem dois representantes da família das stylicinas: STY1 e STY2 (ROLLAND *et al.*, 2010; FARIAS *et al.*, 2019). Devido à proximidade filogenética de camarões do gênero *Farfantepenaeus* com camarões do gênero *Litopenaeus*, foi investigada a presença dos dois subgrupos em amostras de cDNA de hemócitos de *F. paulensis* pela técnica de RT-PCR. Para isso, foram utilizados pares de iniciadores baseados em regiões consenso das sequências de STY1 e STY2 de espécies do gênero *Litopenaeus*.

Houve amplificação do produto esperado utilizando os iniciadores referentes a STY1 (330 pb) e STY2 (335 pb). Os produtos de tamanho esperado foram clonados, sequenciados e suas sequências nucleotídicas confrontadas com bancos de dados. Esses novos AMPs foram classificados como stylicinas dos subgrupos 1 (*Fpau*-Stylicin1) e 2 (*Fpau*-Stylicin2) de *F. paulensis*, e foram depositadas no GenBank com os números de acesso MN510328 (**Figura 22**) e MN510329 (**Figura 23**), respectivamente

Figura 22. Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida de *Fpau*-Stylicin1.

atg	aag	acc	tac	agt	cag	gtc	tct	gtt	ttt	gtc	tta	ttg	ggt	gcg	atc	ctg	cac	acg	tca
M	K	T	Y	S	Q	V	S	V	F	V	L	L	V	A	I	L	H	T	S
caa	gga	tct	tcc	ttt	tca	cca	gca	gcc	ata	gga	cct	ccg	ggc	tgg	aaa	cgt	cca	tgc	gtg
Q	G	S	S	F	S	P	A	A	I	G	P	P	G	W	K	R	P	C	V
cca	caa	tcg	tgc	cca	ccg	tgc	cca	tat	gat	gat	gac	gag	tgt	cca	aag	tgc	gat	gga	ttc
P	Q	S	C	P	P	C	P	Y	D	D	D	E	C	P	K	C	D	G	F
ccg	gtg	tgt	cac	gag	gtg	tgc	ccc	gat	att	cat	ata	gcc	tgt	gac	tgc	ccc	ttc	cac	cat
P	V	C	H	E	V	C	P	D	I	H	I	A	C	D	C	P	F	H	H
agc	tgc	gaa	tgt	ccg	cag	cct	gtg	tgt	gaa	ccc	tgc	gaa	agg	ccc	atc	gcc	gag	ttg	atc
S	C	E	C	P	Q	P	V	C	E	P	C	E	R	P	I	A	E	L	I
aaa	aag	gga	ggc	tat	aaa	gga	taa												
K	K	G	G	Y	K	G	-												

O hífen (-) indica o códon de parada.

Figura 23. Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida de *Fpau-Stylicin2*.

atg	aag	atc	tac	agt	cag	gtc	tct	ggt	ttt	gtc	tta	ttg	ggt	gcg	atc	ctg	cac	acg	tca
M	K	I	Y	S	Q	V	S	V	F	V	L	L	V	A	I	L	H	T	S
caa	gga	tct	tcc	ttt	tca	cca	ccc	agt	gga	ctt	ccg	ggc	tgg	gaa	cct	cca	tgc	gtg	cca
Q	G	S	S	F	S	P	P	S	G	L	P	G	W	E	P	P	C	V	P
caa	tcg	tgc	cca	ccg	tgc	cca	tat	gat	gat	gaa	gag	tgt	cca	aag	tgc	gag	gaa	tta	ccg
Q	S	C	P	P	C	P	Y	D	D	E	E	C	P	K	C	E	E	L	P
gcg	tgt	gag	gag	tgc	ccc	gat	att	cat	ata	gga	tgt	gac	tgc	ccc	ttc	tac	cac	agc	tgc
A	C	E	E	C	P	D	I	H	I	G	C	D	C	P	F	Y	H	S	C
tta	tgt	cgg	cag	cct	ttg	tgt	gaa	ccc	tgc	gaa	agt	ccc	atc	gcc	gag	ttg	atc	aaa	aag
L	C	R	Q	P	L	C	E	P	C	E	S	P	I	A	E	L	I	K	K
gga	aac	tac	aca	gga	taa														
G	N	Y	T	G	-														

O hífen (-) indica o códon de parada

A sequência de *Fpau-Stylicin1* codifica um precursor contendo um peptídeo sinal de 22 resíduos aminoacídicos, seguido de um peptídeo maduro aniônico ($pI = 5,13$) de 9,22 kDa. Assim como as demais stylicinas, *Fpau-Stylicin1* apresenta uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e arginina e uma região C-terminal contendo treze resíduos conservados de cisteína (**Figura 22**). A sequência de *Fpau-Stylicin2* codifica um precursor contendo um peptídeo sinal de 22 resíduos aminoacídicos, seguindo por um peptídeo maduro aniônico ($pI = 4,23$) de 9,07 kDa. Assim como *Fpau-Stylicin1*, esse peptídeo apresenta uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e arginina e uma região C-terminal contendo treze resíduos conservados de cisteína (**Figura 23**). As propriedades bioquímicas das sequências de STY de camarões-rosa estão apresentadas na (**Tabela 5**).

Tabela 5. Propriedades bioquímicas das stylicinas de camarões do gênero *Farfantepenaeus*.

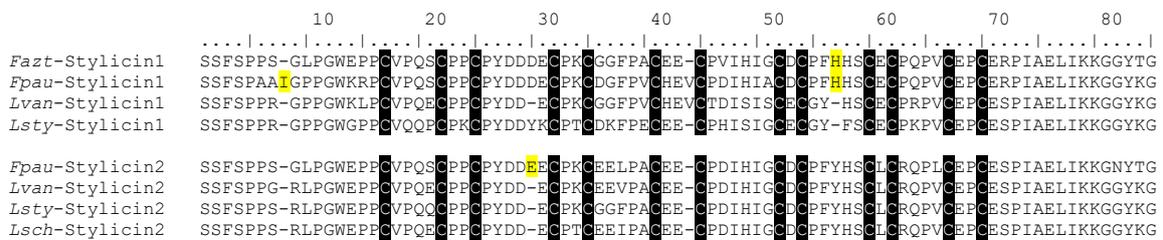
Espécie	GenBank	Identificação	Nº resíduos	MM	pI
STY1					
<i>F. aztecus</i>	GEUA01075974	TSA Project (não anotado)	83	8,86	4,47
<i>F. paulensis</i>	MN510328	Clonagem molecular	83	9,07	4,23
STY2					
<i>F. paulensis</i>	MN510329	Clonagem molecular	85	9,22	5,13

MM: massa molecular predita em kDa. pI: ponto isoelétrico teórico. Valores aniônicos de pI estão destacados na cor vermelha.

As sequências aminoacídicas deduzidas das STY de camarões-rosa foram alinhadas e comparadas com os subgrupos STY1 e STY2 de camarões do gênero *Litopenaeus* (**Figura 24**). As sequências de STY1 de *Farfantepenaeus* apresentaram 77% de identidade entre si e

60-76% de identidade com as sequências de STY1 de camarões do gênero *Litopenaeus*. A sequência de STY2 de *F. paulensis* apresentou 68-82% de identidade com as sequências de STY2 de camarões do gênero *Litopenaeus*.

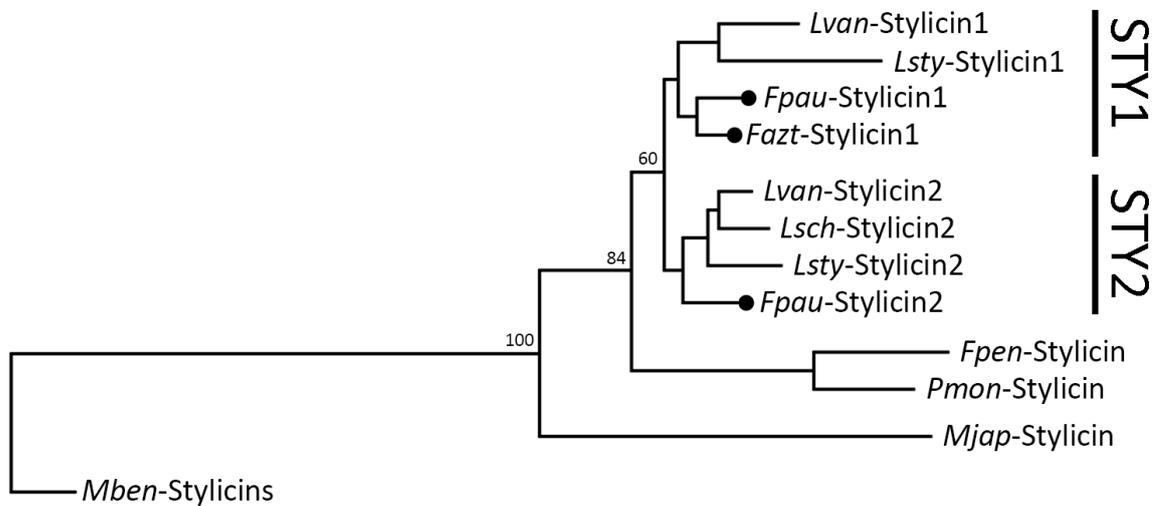
Figura 24. Alinhamento das sequências aminoacídicas das stylicinas (STY1, STY2 e STY).



A régua acima das sequências indica as posições dos resíduos de aminoácidos do peptídeo maduro. Os resíduos excedentes nas sequências de STY1 e STY2 dos camarões do gênero *Farfantepenaeus* estão marcados em amarelo enquanto que os treze resíduos conservados de cisteína estão destacados em preto. Os hifens (-) indicam gaps. Os números de acesso (GenBank) estão apresentados no Apêndice D.

Interessantemente, a sequência *Fpau*-Stylicin1 possui um resíduo de isoleucina a mais na posição 8 do peptídeo maduro em comparação à STY1 de *F. aztecus* e das espécies do gênero *Litopenaeus*. Ambas sequências de STY1 de *Farfantepenaeus* apresentam uma histidina a mais na posição 57 do peptídeo maduro. Comparativamente, *Fpau*-Stylicin2 possui um resíduo aminoacídico a mais que as STY2 de *Litopenaeus* (um ácido glutâmico na posição 29 do peptídeo maduro) (**Figura 24**). Os resultados da representação gráfica (na forma de um cladograma) do alinhamento das diferentes stylicinas mostraram que os dois subgrupos se agruparam em clados distintos (**Figura 25**). Tanto no clado da STY1 quanto no clado da STY2, as stylicinas de *Farfantepenaeus* formaram um grupo distinto das stylicinas dos camarões do gênero *Litopenaeus*.

Figura 25. Representação gráfica, na forma de cladograma, das relações entre as sequências das Stylicinas.



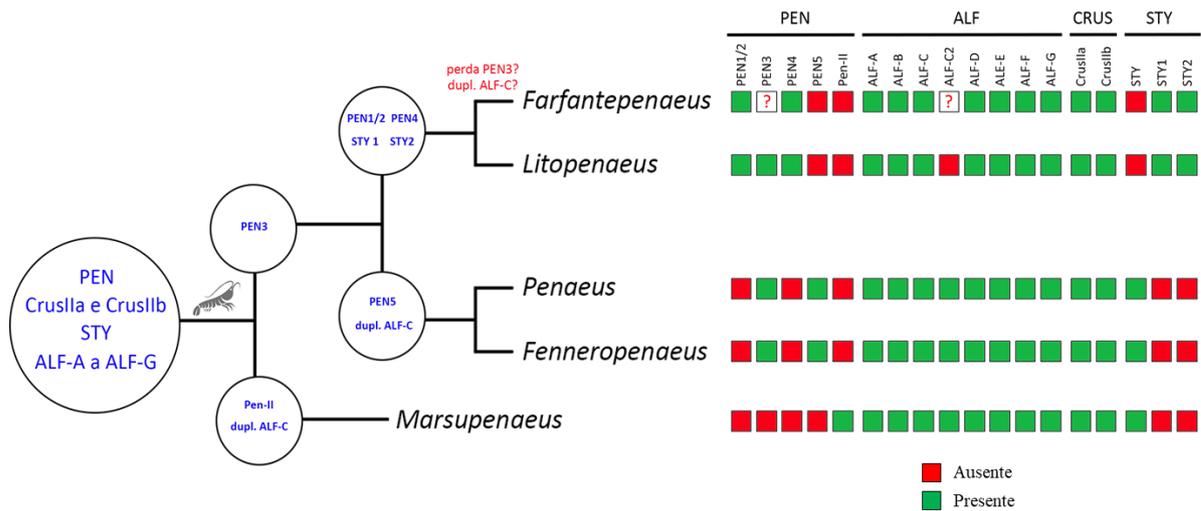
O cladograma foi construído utilizando o método de Neighbor-Joining (1.000 réplicas) no programa MEGA X. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós. Os pontos representam os AMPs encontrados em camarões do gênero *Farfantepenaeus*. Os números de acesso (GenBank) estão apresentados no Apêndice D.

As stylicinas constituem a mais recente família de AMPs descrita em camarões peneídeos, tendo poucos trabalhos que exploram a diversidade dessa família em termos de presença/ausência em diversas espécies. FARIAS e colaboradores (2019) relatam que STY1 e STY2 são genes parálogos que surgiram da duplicação de um único gene antes da especificação do gênero *Litopenaeus*. Este trabalho é o primeiro relato de dois membros dessa família em camarões que não são do gênero *Litopenaeus*. Tais resultados sugerem que ambos os genes das stylicinas surgiram num ancestral comum aos camarões dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Litopenaeus*.

Neste trabalho foi possível detectar sequências codificantes para as peneidinas (PEN1/2 e PEN4), ALFs (Grupo A a G), crustinas (IIa e IIb) e stylicina (STY1 e STY2). Este é o primeiro relato crustinas do tipo IIb e dois grupos de stylicinas em camarões do gênero *Farfantepenaeus*. As peneidinas e stylicinas são AMPs exclusivos de camarões peneídeos, sugerindo que essas famílias vieram de um ancestral comum dos camarões peneídeos. Entretanto, a diversidade dessas famílias ocorreu durante a especificação das espécies, através da duplicação dos genes da peneidina e stylicina em um ancestral comum. Os ALFs e Crustinas não são AMPs exclusivos de camarões peneídeos, eles também são encontrados em

outros crustáceos. Entretanto, não é observada uma grande diversidade de membros dessas famílias em outros crustáceos, sugerindo que essas duas famílias de AMPs surgiram de um ancestral comum dos crustáceos, e foi diversificada em camarões peneídeos.

Figura 26. Representação gráfica da linha evolutiva dos AMPs de camarões peneídeos.

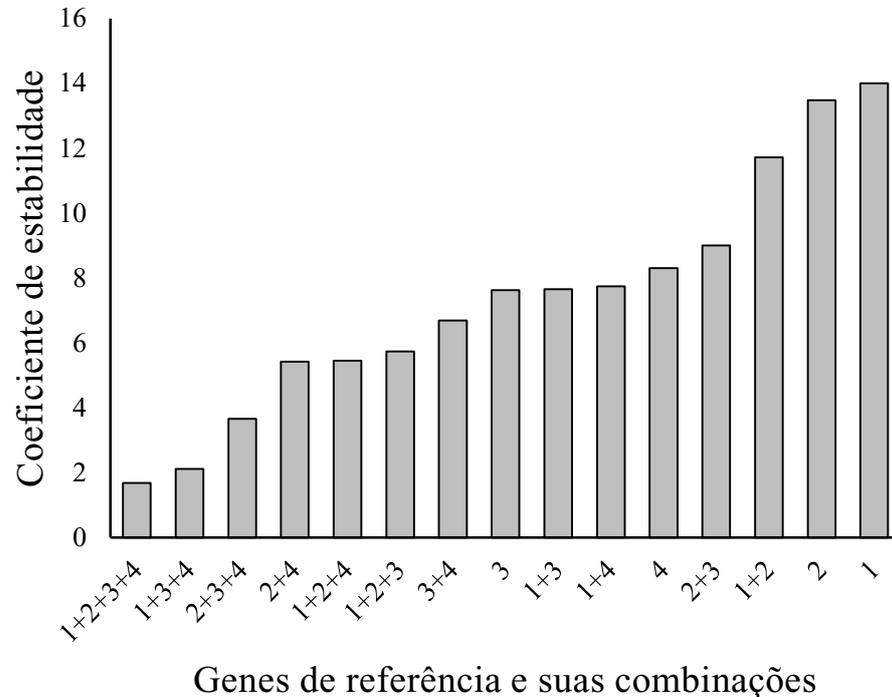


5.2 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS AMPs DE *F. PAULENSIS* FRENTE A INFECÇÕES FÚNGICAS

Os níveis de expressão gênica dos AMPs de *F. paulensis* foram avaliados 24 h e 48 h nos hemócitos em resposta a um desafio com o fungo filamentoso *F. solani*, utilizando a técnica da PCR em tempo real. Para normalizar os cálculos de expressão relativa, foi inicialmente determinada a melhor condição referência. Para isso, quatro genes candidatos foram selecionados com base em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa: Fator de alongação 1 α (EF1 α), β -actina e as proteínas ribossomais (RpS6 e RpS3A) (BARRETO *et al.*, 2018; MATOS *et al.*, 2018; FARIAS *et al.*, 2019). Primeiramente, foram comparados o perfil das curvas de amplificação e os valores de Cq (ciclo de quantificação) de cada um dos quatro genes candidatos entre todas as amostras biológicas. Dos quatro candidatos analisados, todos se apresentaram estáveis entre todas as condições experimentais. O cálculo para a determinação da melhor condição referência foi realizado utilizando o coeficiente de estabilidade dos valores de Cq, calculado pelo programa RefFinder. O coeficiente de estabilidade foi calculado com base nos valores de Cq de cada um dos quatro genes individualmente e na média geométrica das diferentes combinações entre eles. A condição que apresentou a menor variação de expressão em hemócitos foi a média geométrica

dos quatro genes (**Figura 27**). Esses valores foram utilizados na primeira normalização (ΔCq) dos cálculos de expressão gênica relativa.

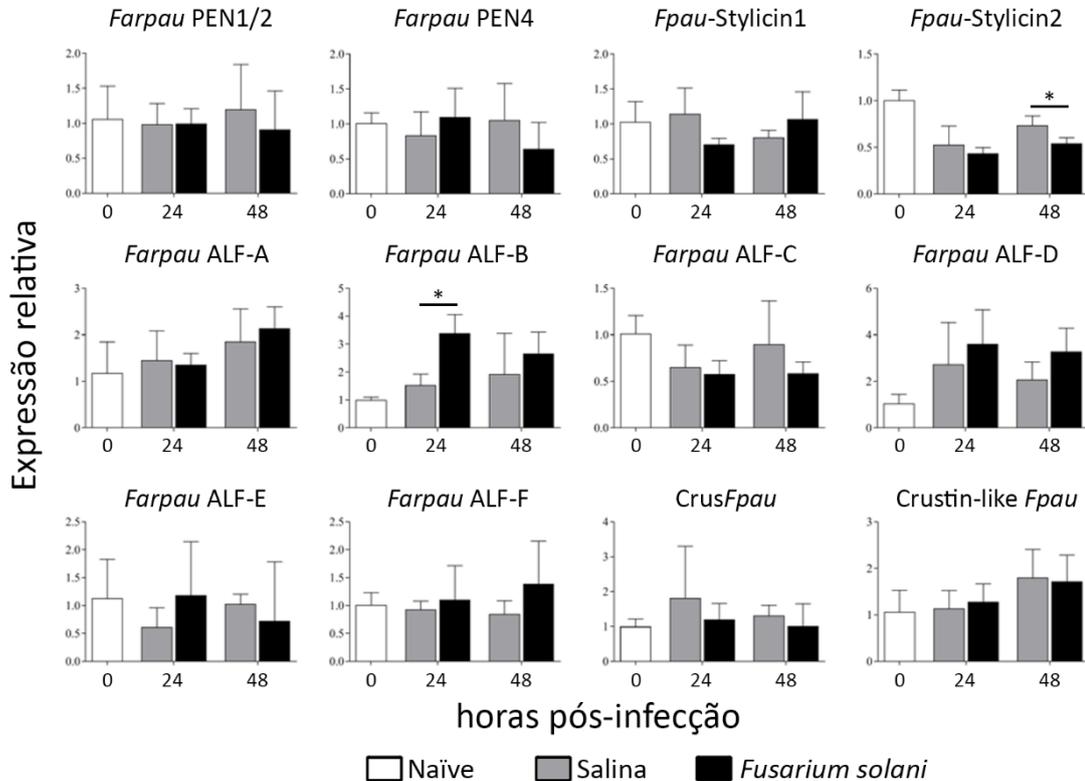
Figura 27. Coeficiente de estabilidade dos candidatos à referência.



Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes e da média geométrica de suas diferentes combinações. 1: EF1 α ; 2: RpL40; 3: RpS6; 4: β -actina.

Foi avaliada apenas a expressão dos AMPs encontrados em *Farfantepenaeus* nesse estudo: *Farpau* PEN1/2; *Farpau* PEN4; *Farpau* ALF-A ao G; *CrusFpau*, *Crustin-like Fpau*; *Fpau*-Stylicin1 e *Fpau*-Stylicin2 (**Figura 28**). Todos os genes se mostraram expressos em hemócitos circulantes, com exceção do ALF-G. Os ALFs são a família mais diversa de AMPs e sua expressão não é restrita apenas nos hemócitos. Em camarões *L. vannamei*, ALF-G apresenta-se expresso exclusivamente em hemócitos (MATOS *et al.*, 2018), porém em *F. chinensis* sua expressão mostrou-se restrita ao órgão linfóide (LI *et al.*, 2019). O único relato da presença do ALF-G em camarões-rosa foi no transcrito de hepatopâncreas da espécie *F. aztecus*, sugerindo que esse AMP possa não ser hemocitário em camarões-rosa.

Figura 28. Níveis transcricionais dos AMPs de *Farfantepenaeus paulensis* em resposta à infecção com o fungo *Fusarium solani*.



Expressão relativa dos AMPs nos hemócitos de *Farfantepenaeus paulensis*. As barras representam média \pm desvio padrão (3 pools de 3 animais). Diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$) estão apontadas com asterisco (*).

Neste trabalho, a expressão de *Farpau* ALF-B foi induzida (1,89 vezes, $P < 0,05$) nos hemócitos de *F. paulensis* após 24 h de uma infecção fúngica, voltando aos níveis basais em 48 h. Não existem relatos de modulação gênica dos ALFs mediante infecções fúngicas em camarões nativos, no entanto, em *L. vannamei* ALFs dos Grupos A, B e D não são regulados mediante a um desafio fúngico. Além disso, a expressão desse AMP pode ocorrer também durante uma fase tardia da infecção (após 72 h) (de LORGERIL *et al.*, 2008). Apesar de não regulados, sabe-se que alguns ALFs estão envolvidos nas respostas de defesa contra fungos filamentosos (de la VEGA *et al.*, 2008). Através de técnicas de RNA de interferência, de la VEGA e colaboradores (2008) demonstraram que ALFs do Grupo A são essenciais para a sobrevivência de camarões durante uma infecção com o fungo *F. oxysporum*. Como os animais selvagens são naturalmente expostos a patógenos frequentemente, neste cenário, a imunidade dos animais nativos à enfermidade é alta, dificultando a ocorrência de infecção.

Para uma melhor avaliação da expressão desses AMPs, deve ser necessário realizar a análise de expressão dos AMPs nas primeiras horas de infecção.

Ao contrário do ALF-B, a expressão de STY2 foi reprimida (1,30 vezes, $P < 0,05$) em 48 h após infecção. De acordo com FARIAS e colaboradores (2019) ambas STYs são fortemente induzidas em resposta aos padrões moleculares associados a perigo (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs) e que esses AMPs podem estar envolvidos na inflamação precoce e no processo de cicatrização de feridas. Além disso, as stylicinas possuem um potencial efeito opsonizante que parece facilitar a eliminação intracelular dos patógenos através da fagocitose (ROLLAND *et al.*, 2010). No caso de desafios bacterianos, enquanto STY1 parece não ser modulada, STY2 é modulada positivamente frente a infecções experimentais com *Vibrio* (FARIAS *et al.*, 2018). Por outro lado, ambas stylicinas são fortemente reprimidas em *L.vannamei* durante uma infecção letal por *F. solani* (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Todos os outros genes analisados neste estudo não foram modulados em 24 h e 48 h após infecção e isso pode ser devido ao tempo e o tecido de análise. Uma vez estabelecida a infecção por *Fusarium*, observa-se uma resposta inflamatória intensa nas brânquias dos animais infectados. Para combater essa infecção, hemócitos com alta expressão de AMPs migram para o tecido infectado (brânquias) nas primeiras 12 h e 24 h de infecção (MUÑOZ *et al.*, 2002; SEQUEIRA *et al.*, 1996). Essa migração é necessária para os hemócitos realizarem processos de defesa celulares, como a fagocitose, a formação de nódulos (dos esporos) e cápsulas (das hifas) e também lise celular, liberando imunofatores como os AMPs para a eliminação do fungo.

6 PRINCIPAIS RESULTADOS

- Camarões do gênero *Farfantepenaeus* possuem sequências codificantes dos diferentes membros das quatro famílias de AMPs de camarões peneídeos;
- Este trabalho relata a primeira descrição de uma crustina do Tipo IIb e de stylicinas (STY1 e STY2) em camarões do gênero *Farfantepenaeus*;
- Dentre os AMP analisados, ALF-B e STY2 foram moduladas positivamente e negativamente, respectivamente, em *Farfantepenaeus paulensis* infectados com o fungo filamentosso *Fusarium solani*.

7 CONCLUSÃO

Os diferentes membros das quatro famílias de peptídeos antimicrobianos (AMPs) de camarões peneídeos são expressos em camarões peneídeos do gênero *Farfantepenaeus* e diferencialmente modulados frente a infecções fúngicas.

REFERÊNCIAS

- AMPARYUP, P.; DONPUDSA, S.; TASSANAKAJON, A. Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 1497–1509, 2008.
- AN, M. Y. *et al.* A new subfamily of penaeidin with an additional serine-rich region from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) contributes to antimicrobial and phagocytic activities. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 59, p. 186–196, 2016.
- AZUARA, V. *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 532–538, 2006.
- BACHÈRE, E. *et al.* Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 149–168, 2004.
- BACHÈRE, E.; DESTOUMIEUX, D.; BULET, P. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: A comparison with other effectors of innate immunity. **Aquaculture**, v. 191, n. 1–3, p. 71–88, 2000.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides Bahar, Ali Adem, and Dacheng Ren. 2013. “Antimicrobial Peptides.” *Pharmaceuticals*. doi:10.3390/ph6121543. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 2013.
- BARRACCO, M. A. *et al.* Molecular characterization of penaeidins from two Atlantic brazilian shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus schmitti*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, n. 1, p. 117–120, 2005.
- BARRETO, C. *et al.* Specific molecular signatures for type II crustins in penaeid shrimp uncovered by the identification of crustin-like antimicrobial peptides in *litopenaeus vannamei*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 1, p. 5–7, 2018.
- BARRIOS ANDRÉS, J. L. *et al.* Endophthalmitis caused by *Fusarium*: An emerging problem in patients with corneal trauma. A case series. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 2, p. 92–96, 2018.
- BARTLETT, T. C. *et al.* Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 278 ± 293, 2002.
- BROCKTON, V.; HAMMOND, J. A.; SMITH, V. J. Gene characterisation, isoforms and recombinant expression of carcinin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 943–949, 2007.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–50, 2005.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

- CARRIEL-GOMES, M. C. *et al.* In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 469–472, 2007.
- CHEUNG, R. C. F.; NG, T. B.; WONG, J. H. **Marine peptides: Bioactivities and applications**. [s.l.: s.n.]v. 13
- COSTEIRA, J.; PINA, J. Caso Clínico Clinical Case. **Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)**, v. 13, n. 6, p. 869–877, 2007.
- CUTHBERTSON, B. J. *et al.* A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. **Biochemical Journal**, v. 381, n. 1, p. 79–86, 2004.
- CUTHBERTSON, B. J. *et al.* Solution structure of synthetic penaeidin-4 with structural and functional comparisons with penaeidin-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16009–16018, 2005.
- CUTHBERTSON, B. J. *et al.* Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 167–181, 2008.
- CUTHBERTSON, B. J.; BÜLLESBACH, E. E.; GROSS, P. S. Discovery of synthetic penaeidin activity against antibiotic-resistant fungi. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 68, p. 120–127, 2006.
- DE LA VEGA, E. *et al.* Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1916–1925, 2008.
- DE LORGERIL, J. *et al.* Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. **Physiological Genomics**, v. 21, p. 174–183, 2005.
- 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**, v. 276, n. 50, p. 47070–47077, 2001.
- DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. *et al.* Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, 2016.
- DESTOUMIEUX, D. *et al.* Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, p. 28398–28406, 1997.
- DESTOUMIEUX, D. *et al.* Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, p. 335±346, 1999.
- DESTOUMIEUX, D. *et al.* Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of cell science**, v. 113, p. 461–469, 2000.
- DU, Z. Q. *et al.* A double WAP domain (DWD)-containing protein with proteinase inhibitory

- activity in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, n. 2, p. 203–210, 2009.
- DU, Z. Q.; JIN, Y. H. Molecular Characterization and Antibacterial Activity Analysis of Two Novel Penaeidin Isoforms from Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 8, p. 1607–1620, 2015.
- FARIAS, N. D. *et al.* *Litopenaeus vannamei* stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, p. 82–92, 2019.
- GARIGLIO P., BELLARD M. Nucleic Acids Research erythrocytes Nucleic Acids Research. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 8, p. 2589–2598, 1981.
- GONCALVES, P. *et al.* Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, 2014.
- 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 and Comparative Immunology**, v. 25, n. 7, p. 565–577, 2001.
- GUANÍ-GUERRA, E. *et al.* Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, p. 1–11, 2010.
- GUEGUEN, Y. *et al.* PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 283–288, 2006.
- HARRIS, F.; DENNISON, S.; PHOENIX, D. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, p. 585–606, 2009.
- 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**, v. 12, n. 9, p. 3351–3356, 1993.
- IMJONGJIRAK, C. *et al.* Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 841–850, 2009.
- JIANG, H. S. *et al.* Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, n. 2, p. 387–395, 2015.
- KAMYSZ, W.; OKRÓJ, M.; ŁUKASIAK, J. Novel properties of antimicrobial peptides. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 2, p. 461–469, 2003.
- KANG, C. J. *et al.* Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. **Molecular Immunology**, 2007.
- KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo.

Biomolecules, v. 8, n. 4, 2018.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 2018.

LI, C. Y.; SONG, Y. L. Proline-rich domain of penaeidin molecule exhibits autocrine feature by attracting penaeidin-positive granulocytes toward the wound-induced inflammatory site. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, n. 6, p. 1044–1052, 2010.

LIU, H. T. *et al.* Identification and expression analysis of a novel stylicin antimicrobial peptide from Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 47, n. 2, p. 817–23, 2015.

LIU, Y. *et al.* A serpin from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to bacteria and WSSV challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, n. 3, p. 345–351, 2009.

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**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LÖFGREN, S. E. *et al.* Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 197–202, 2008.

MATOS, G. M. *et al.* Massive gene expansion and sequence diversification is associated with diverse tissue distribution, regulation and antimicrobial properties of anti-lipopolysaccharide factors in shrimp. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, 2018.

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

O'LEARY, N. A.; GROSS, P. S. Genomic structure and transcriptional regulation of the penaeidin gene family from *Litopenaeus vannamei*. **Gene**, v. 371, n. 1, p. 75–83, 2006.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1605–1612, 2004.

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

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**, v. 17, n. 2, p. 106–113, 1999.

RELF, J. M. *et al.* Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 350–357, 1999.

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

ROSA, R. D. *et al.* Functional Divergence in Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors (ALFs): From Recognition of Cell Wall Components to Antimicrobial Activity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 17–19, 2013.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, n. 2, p. 262–284, 2010.

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 - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 958–970, 2016.

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**, v. 240, p. 532–539 (1996), 1996.

SEN, R.; NAYAK, L.; DE, R. K. A review on host–pathogen interactions: classification and prediction. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 10, p. 1581–1599, 2016.

SEQUEIRA, T.; TAVARES, D.; ARALA-CHAVES, M. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 20, n. 2, p. 97–104, 1996.

SHOCKEY, J. E. *et al.* The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 668–673, 2009.

SMITH, V. J. *et al.* Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 758–772, 2008.

SMITH, V. J. Phylogeny of whey acidic protein (WAP) four-disulfide core proteins and their role in lower vertebrates and invertebrates. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, p. 1403–1408, 2011.

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

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

SUN, C. *et al.* An anti-lipopolysaccharide factor from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, exhibited antimicrobial activities in vitro and in vivo. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 295–303, 2011.

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

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

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**, v. 105, n. 2, p. 717–723, 1982.

TASSANAKAJON, A. *et al.* **Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp Marine Biotechnology**, 2010. .

TASSANAKAJON, A. *et al.* Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 80, p. 81–93, 2018.

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

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

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

VAN VALEN, L. A new evolutionary theory. **Evolutionary Theory**, 1973.

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

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016.

XIAO, B. *et al.* Penaeidins are a novel family of antiviral effectors against WSSV in shrimp. *bioRxiv*, v. 74, n. 5, p. 1195–1200, 2018.

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

YANG, Y. *et al.* NMR structure of rALF-Pm3, an anti-lipopolysaccharide factor from shrimp: Model of the possible lipid A-binding site. **Biopolymers**, v. 91, n. 3, p. 207–220, 2009.

YOUNT, N. Y. *et al.* Advances in antimicrobial peptide immunobiology. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 84, p. 435–458, 2006.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms: My perspective. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1117, n. January, p. 3–6, 2019.

APÊNDICE A – Sequências de peneidinas utilizadas

Espécie	GenBank	Nome da sequência	Subgrupo peneidina	Características bioquímicas (Peptídeo maduro)		
				nº aa	MM (kDa)	pI
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Y14925	<i>Litvan</i> PEN1/2	PEN1/2	51	5,58	9,55
	AF387661	<i>Litvan</i> PEN3	PEN3	63	6,69	9,89
	DQ211701	<i>Litvan</i> PEN4	PEN4	48	5,23	8,92
<i>Litopenaeus schmitti</i>	AY956418	<i>Litsch</i> PEN1/2	PEN1/2	51	5,54	9,43
	FJ472344	<i>Litsch</i> PEN3	PEN3	56	6,16	9,81
	AY956420	<i>Litsch</i> PEN4	PEN4	48	5,3	8,92
<i>Litopenaeus setiferus</i>	AY039205	<i>Litset</i> PEN1/2	PEN1/2	51	5,53	9,43
	AY039206	<i>Litset</i> PEN3	PEN3	56	6,19	9,81
	AY039207	<i>Litset</i> PEN4	PEN4	48	5,36	9,15
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	AY351655	<i>Litssty</i> PEN1/2	PEN1/2	51	5,67	9,55
	AY351656	<i>Litssty</i> PEN3-1	PEN3	68	7,24	10,24
	DQ010422	<i>Litssty</i> PEN3-2	PEN3	60	6,48	9,89
<i>Farfantepenaesus paulensis</i>	MN510326	<i>Farpau</i> PEN4	PEN4	50	5,33	8,96
	AY956416	<i>Farpau</i> PEN1/2	PEN1/2	52	5,84	9,69
<i>Farfantepenaesus aztecus</i>	GEUA01018693	<i>Farazt</i> PEN1/2	PEN1/2	52	5,76	9,5
<i>Farfantepenaesus brasiliensis</i>	EF450745	<i>Farbra</i> PEN1/2	PEN1/2	52	5,89	9,81
<i>Farfantepenaesus subtilis</i>	EF450742	<i>Farsub</i> PEN1/2	PEN1/2	52	5,92	9,63
<i>Metapenaesus monoceros</i>	KF275674	<i>Metmon</i> PEN5	PEN5	52	5,66	9,38
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	AY260151	<i>Fenchi</i> PEN3	PEN3	52	5,58	9,77
	DQ153253	<i>Fenchi</i> PEN5	PEN5	60	6,44	9,55
<i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	EU333492	<i>Fenpen</i> PEN3-1	PEN3	63	6,71	9,89
	GFRT01009141	<i>Fenpen</i> PEN3-2	PEN3	52	5,51	9,86
<i>Fenneropenaeus indicus</i>	HM535649	<i>Fenind</i> PEN3	PEN3	58	6,3	9,5
	JX657680	<i>Fenind</i> PEN5-1	PEN5	52	5,66	9,38
	HM535650	<i>Fenind</i> PEN5-2	PEN5	61	6,38	9,5
<i>Marsupenaesus japonicus</i>	NIUR012179668	-	-	124	12,82	10,6
	KU057370	<i>MjPen-II</i>	Subfamily II	117	12,1	10,57
<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	MK038876	<i>Fenmer</i> PEN3	PEN3	52	5,86	9,76
	MK038877	<i>Fenmer</i> PEN5	PEN5	60	6,47	9,69
<i>Penaeus monodon</i>	AY326471	<i>Penmon</i> PEN3	PEN3	55	6,05	9,3
	GH717905	<i>Penmon</i> PEN5	PEN5	60	6,47	9,64
<i>Penaeus semisulcatus</i>	-	<i>Pensem</i> PEN3	PEN3	52	5,6	9,61

nº aa: número de aminoácidos. MM: massa molecular predita em kDa. pI: ponto isoelétrico teórico.

APÊNDICE B – Sequências de ALFs utilizadas

Espécies	GenBank	Nome da sequência	Grupo ALF	Características bioquímicas (Peptídeo maduro)		
				n° aa	MM (kDa)	pI
<i>Litopenaeus vannamei</i>	GETD01024664	<i>Litvan</i> ALF-A	A	98	11,46	7,09
	GQ227486	<i>Litvan</i> ALF-B	B	97	11,07	10,09
	GETD01033447	<i>Litvan</i> ALF-C	C	98	11,06	9,50
	FE115964	<i>Litvan</i> ALF-D	D	98	10,78	5,58
	FE069658	<i>Litvan</i> ALF-E	E	99	11,11	6,11
	KJ000049	<i>Litvan</i> ALF-F	F	98	11,28	8,62
	GETZ01049665	<i>Litvan</i> ALF-G	G	105	12,12	5,02
<i>Litopenaeus schmitti</i>	DQ991357	<i>Litsch</i> ALF-B	B	98	11,14	10,18
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	KC346373	<i>Litssty</i> ALF-B	B	98	11,14	10,24
	DQ010421	<i>Litssty</i> ALF-D	D	98	10,81	6,10
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	EF601051	<i>Farpau</i> ALF-B	B	98	11,19	10,17
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01066862	<i>Farazt</i> ALF-A	A	98	11,48	6,45
	GEUA01068264	<i>Farazt</i> ALF-B	B	98	11,23	10,08
	GEUA01066953	<i>Farazt</i> ALF-C	C	98	11,06	9,50
	GEUA01067287	<i>Farazt</i> ALF-D	D	98	10,82	5,60
	GEUA01004511	<i>Farazt</i> ALF-E	E	99	11,17	5,63
	GEUA01070429	<i>Farazt</i> ALF-F	F	98	11,15	9,47
	GEUA01069818	<i>Farazt</i> ALF-G	G	105	11,94	5,86
<i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	GFRT01025471	<i>Fenpen</i> ALF-A	A	98	11,49	7,09
	GFRT01025680	<i>Fenpen</i> ALF-B	B	98	11,15	10,11
	GFRT01017039	<i>Fenpen</i> ALF-C	C	98	11,25	9,77
	GFRT01004925	<i>Fenpen</i> ALF-D	D	98	10,74	5,72
	GFRT01004448	<i>Fenpen</i> ALF-F	F	98	11,06	8,66
<i>Fenneropenaeus indicus</i>	GU727863	<i>Fenind</i> ALF-B	B	98	11,19	10,09
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	JX853777	<i>Fc</i> ALF4	A	98	11,45	6,06
	AY859500	ALFFc	B	98	11,20	10,29
	JX853775	<i>Fc</i> ALF2	C	98	11,09	9,18
	JX853776	<i>Fc</i> ALF3	C	98	10,94	5,27
	JX853779	<i>Fc</i> ALF6	D	98	10,77	5,23
	JX853778	<i>Fc</i> ALF5	E	99	11,12	5,64
	MH998632	<i>Fc</i> ALF8	G	105	12,35	6,93
<i>Penaeus monodon</i>	JX853774	<i>Fc</i> ALF1	F	98	11,06	8,64
	EF523561	ALFPm2	A	98	11,43	6,46
	EF523562	ALFPm3	B	98	11,05	9,95
	JN562340	ALFPm6	C	98	11,28	9,77
	KX431031	ALFPm7	C	98	11,14	8,74
	GEME01010116	ALFPm8	D	98	10,80	5,26
	GEEP01059175	ALFPm9	E	99	11,06	6,12
	GEME01077326	ALFPm10	F	98	11,07	9,04
JR205808	ALFPm11	G	105	12,23	6,13	
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AB453738	<i>Mj</i> ALF-A1	A	98	11,49	5,88
	KY627759	<i>Mj</i> ALF-B	B	98	11,04	9,64
	AB210110	<i>Mj</i> ALF-C1	C	98	11,30	7,98
	KU160498	<i>Mj</i> ALF-C2	C	98	11,27	9,51
	-	<i>Mj</i> ALF-D2	D	98	10,92	5,76
	KY627761	<i>Mj</i> ALF-E2	E	101	11,40	5,33
	KU160499	<i>Mj</i> ALF-D1	F	98	11,32	9,20
	-	<i>Mj</i> ALF-A2	G	102	11,55	5,25

n° aa: número de aminoácidos. MM: massa molecular predita em kDa. pI: ponto isoelétrico teórico.

APÊNDICE C – Sequências de crustinas utilizadas

Espécies	GenBank	Nome da sequência	Tipo crustina	Características bioquímicas (Peptídeo maduro)		
				n° aa	MM (kDa)	pI
<i>Litopenaeus vannamei</i>	FE099583	Carcinin <i>Lv</i> 2	Tipo I	103	11,55	7,66
	JQ824114	Crustin-like <i>Lv</i>	Tipo IIb	130	12,66	8,02
<i>Litopenaeus setiferus</i>	AF430078	Crustin <i>Ls</i>	Tipo IIa	171	16,1	7,62
<i>Litopenaeus schmitti</i>	EF182748	Crus <i>Lsch</i>	Tipo IIa	149	14,52	7,62
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01009615	Crus <i>Fazt</i>	Tipo IIa	156	15,15	8,29
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	MN510327	Crustin-like <i>Fpau</i>	Tipo IIb	138	13,87	7,97
	EF182747	Crus <i>Fpau</i>	Tipo IIa	151	14,67	8,29
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>	EF601055	Crus <i>Fbra</i>	Tipo IIa	157	15,32	8,29
<i>Farfantepenaeus subtilis</i>	EF450744	Crus <i>Fsub</i>	Tipo IIa	129	13,00	8,03
<i>Penaeus monodon</i>	-	Carcinin <i>Pm</i> 2	Tipo I	111	12,28	7,63
	FJ686014	crustin <i>Pm</i> 1	Tipo IIa	129	13,74	8,29
	FJ686015	crustin <i>Pm</i> 4	Tipo IIa	251	22,45	8,86
	EF654658	crustin <i>Pm</i> 7	Tipo IIb	124	12,49	8,30
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	-	<i>Mj</i> CruI-1	Tipo I	93	10,76	7,67
	-	<i>Mj</i> CruI-2	Tipo I	108	11,91	6,19
	AB121740	Crustin <i>Mj</i>	Tipo IIa	173	16,81	8,48
	-	Crustin-like <i>Mj</i>	Tipo IIb	151	14,47	8,65
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	EU500912	Carcinin <i>Fc</i>	Tipo I	134	17,79	4,64
	FJ853148	<i>Fc</i> -crus 3	Tipo I	134	15,47	4,56
	FJ853147	<i>Fc</i> -crus2	Tipo IIa	114	12,32	8,50
	DQ097703	Cru <i>Fc</i>	Tipo IIb	117	11,9	7,59
	GFRT01002738	Crustin <i>Fpen</i>	Tipo IIa	134	13,78	8,30
<i>Fenneropenaeus indicus</i>	GQ469987	<i>Fi</i> -crustin	Tipo IIb	100	10,61	7,59

n° aa: número de aminoácidos. MM: massa molecular predita em kDa. pI: ponto isoelétrico teórico.

APÊNDICE D – Sequências de stylicinas utilizadas

Espécies	GenBank	Nome da sequência	Subgrupo stylicina	Características bioquímicas (Peptídeo maduro)		
				nº aa	MM (kDa)	pI
<i>Litopenaeus vannamei</i>	MH108957	<i>Lvan</i> -Stylicin1	STY1	82	8,83	4,98
	MH108958	<i>Lvan</i> -Stylicin2	STY2	82	8,99	4,47
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	EU177436	<i>Lsty</i> -Stylicin1	STY1	82	9,03	5,00
	EU177437	<i>Lsty</i> -Stylicin2	STY2	82	8,93	4,74
<i>Litopenaeus schmitti</i>	-	<i>Lsch</i> -Stylicin2	STY2	82	9,01	4,35
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	MN510328	<i>Fpau</i> -Stylicin1	STY1	85	9,22	5,13
	MN510329	<i>Fpau</i> -Stylicin2	STY2	83	9,07	4,23
<i>Farfantepenaeus aztecus</i>	GEUA01075974	<i>Fazt</i> -Stylicin	STY	83	8,86	4,47
<i>Fenneropenaeus penicillatus</i>	GFRT01005742	<i>Fpen</i> -Stylicin	STY	81	8,85	6,23
<i>Penaeus monodon</i>	JZ892895	<i>Pmon</i> -Stylicin	STY	81	8,77	5,70
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	KR063277	<i>Mjap</i> -Stylicin	STY	82	8,69	4,79
<i>Metapenaeus benettiae</i>	GHDJ01013708	<i>Mpen</i> -Stylicin	SY Y	73	8,07	7,99

nº aa: número de aminoácidos. MM: massa molecular predita em kDa. pI: ponto isoelétrico teórico.