



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Nicolas Argenta da Conceição

Caracterização molecular e funcional de kammaricinas, uma nova família de peptídeos antimicrobianos de camarões peneídeos

Florianópolis
2020

Nicolas Argenta da Conceição

Caracterização molecular e funcional de kammaricinas, uma nova família de peptídeos antimicrobianos de camarões peneídeos

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis

2020

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

da Conceição, Nicolas Argenta

Caracterização molecular e funcional de kammaricinas,
uma nova família de peptídeos antimicrobianos de camarões
peneídeos / Nicolas Argenta da Conceição ; orientador,
Rafael Diego da Rosa, 2020.

58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Crustáceos. 3.
Imunidade de invertebrados. 4. Peptídeos de defesa do
hospedeiro. 5. Atividade antimicrobiana. I. da Rosa,
Rafael Diego. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.
III. Título.

Nicolas Argenta da Conceição

Caracterização molecular e funcional de kammaricinas, uma nova família de peptídeos antimicrobianos de camarões peneídeos

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. Fabienne Antunes Ferreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Andréa Cristina Fogaça
Universidade de São Paulo

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

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa
Orientador

Florianópolis, 20 de novembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer o meu orientador, Rafael Diego da Rosa. Você começou a me orientar muito antes do mestrado (já faz quatro anos que eu estou no LIAA!). Não escolhi continuar no LIAA após a graduação apenas pela área que tanto gosto, mas também porque sabia que você seria o orientador perfeito para fazer eu crescer na área acadêmica. Você é o tipo de pessoa que se preocupa muito com os seus alunos, sempre estando disposto a ajudar e procurando oportunidades para nós. Foi você quem sempre estava dizendo para nós participarmos de X, Y ou Z congressos e também foi você quem me apresentou à Delphine e Paulina, pessoas incríveis que também trabalham com AMPs. A minha vida vai mudar de cabeça para baixo quando sair do LIAA, mas saiba que me sinto preparado para continuar nessa trajetória por ter tido você como orientador. Muito obrigado por tudo!

À Luciane por sempre estar interessada no meu trabalho, me dar a oportunidade de trabalhar em colaboração com os alunos dela e, principalmente, por se preocupar comigo. Você sempre se mostrou interessada em saber como eu e os demais estudantes do LIAA estávamos nos sentindo.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e aos responsáveis pelo financiamento do projeto.

Também gostaria de agradecer a todos os professores e professoras responsáveis pela minha formação, tanto da graduação quanto do mestrado. Sei que muitos de vocês se dedicam ao máximo para ensinar da forma mais didática possível os alunos, mesmo tendo uma carga exaustiva.

Obviamente não poderia deixar de agradecer aos meus antigos e atuais colegas de laboratório. Talita, Juliana, Lara, Marco, Natan, Leonardo, Iago e Leandra, passei muito tempo com vocês dentro e fora do laboratório e vocês me ajudaram a crescer muito profissionalmente. Gostaria de deixar um agradecimento especial ao Gabriel, Cairé, Gustavo, Flávio e Mari. Vocês cinco são muito importantes para mim, adorei compartilhar risadas com vocês e espero que continuemos sendo amigos mesmo depois de muito tempo.

Obrigado aos colegas de corredor, especialmente à Maiara, Alessandra e Danizinha. Adorei passar as tardes tomando café na copa com vocês enquanto dávamos risada da vida.

Também gostaria de agradecer aos meus primos Luís, Ícaro, Emi, Pj e Athos. Convivo muito com vocês e adoro passar as tardes de domingo jogando ou conversando com vocês. Um abraço especial ao Lulu que é o primo que mais convivo e me pareço (talvez por que temos apenas 22 dias de diferença?), obrigado por tudo.

Letícia, você fez parte de um momento muito especial da minha vida. Você me ajudou a entender melhor como eu me sinto e como expressar meus sentimentos. Para mim, todos os dias que eu passo com você são dias especiais porque você me ajudou a entender o verdadeiro significado de amor. Só de pensar que posso ficar longe de você por muito tempo o meu coração dói, mas sei que nós vamos conseguir se seguirmos de mãos dadas. Saiba que você e o seu sorriso bonito sempre serão meu porto seguro. Eu te amo.

Por fim, gostaria de agradecer meus pais por terem me criado da forma que criaram. Foi graças a vocês que me tornei a boa pessoa que sou hoje e com certeza irei sentir muitas saudades de vocês nas próximas fases da minha vida. Amo vocês!

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são importantes efetores encontrados em praticamente todas as formas de vida, onde atuam como uma primeira linha de defesa de forma rápida e inespecífica. Em camarões peneídeos, quatro famílias de AMPs contendo cisteínas foram descritas: peneidinas, crustinas, fatores anti-lipopolissacarídeos e stylicinas. Neste trabalho, reportamos a identificação e a caracterização molecular e funcional de uma nova família de AMPs específica de camarões peneídeos, a qual foi nomeada de kammaricina (uma referência à palavra grega “kámmaros”, que significa “camarão”). As kammaricinas (KAM) são codificadas como precursores compostos por um peptídeo sinal e uma região de pró-domínio, seguido por um polipeptídeo linear altamente catiônico desprovido de cisteínas. Essa família de AMPs é composta por pelo menos dois membros (KAM1 e KAM2), os quais são codificados por genes diferentes. Interessantemente, o gene KAM2 pode realizar *splicing* alternativo para gerar precursores distintos. O perfil transcricional desses AMPs foi avaliado em termos de distribuição tecidual e regulação gênica em *Litopenaeus vannamei*, a espécie de camarão mais cultivada no mundo. Transcritos de ambos os genes foram detectados nos hemócitos e se mostraram altamente induzidos em resposta a três patógenos não relacionados, a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi*, o fungo filamentoso *Fusarium solani* e o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). O peptídeo recombinante rLitvan KAM1 de *L. vannamei* apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em baixas concentrações (<10 µM). Este estudo revelou um novo AMP promissor que pode ser usado para o desenvolvimento de novas estratégias no gerenciamento e controle de doenças infecciosas de camarões ou como uma alternativa aos antibióticos clássicos.

Palavras-chave: crustáceos, imunidade de invertebrados, peptídeos de defesa do hospedeiro, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are important effectors found in virtually all life forms where they act as a rapid and non-specific first line of defense. In penaeid shrimp, four cysteine-containing AMP families were described: penaeidins, crustins, anti-lipopolysaccharide factors and stylicins. Here, we report the identification and the molecular and functional characterization of a novel family of shrimp-specific AMPs, which was named as kammaricin (after the Greek word 'kámmaros', meaning shrimp). Kammaricins (KAM) are encoded as precursors composed of a signal peptide and a pro-domain region, followed by a highly cationic linear polypeptide lacking any cysteines. This AMP family is composed by at least two members (KAM1 and KAM2) which are encoded by different genes. Interestingly, the KAM2 gene can perform alternative splicing to generate distinct precursors. The transcriptional profile of these AMPs was evaluated in terms of tissue distribution and regulation in *Litopenaeus vannamei*, the most cultivated shrimp species. Both KAM genes were found to be expressed in hemocytes and highly induced in response to three unrelated shrimp pathogens, the Gram-negative *Vibrio harveyi*, the filamentous fungus *Fusarium solani* and the White spot syndrome virus (WSSV). The recombinant rLitvan KAM1 from *L. vannamei* showed antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria at low concentrations (<10 μ M). This study revealed a promising new nature-based AMP which can be used for the development of novel strategies in shrimp infectious disease management or as an alternative to classic antibiotics.

Keywords: crustaceans, invertebrate immunity, host defense peptides, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características estruturais e espectro de atividade das peneidinas.....	16
Figura 2 – Características estruturais e espectro de atividade dos ALFs.....	18
Figura 3 – Características estruturais e espectro de atividade das crustinas.....	20
Figura 4 – Características estruturais e espectro de atividade das stylicinas.....	22
Figura 5 – Esquema ilustrativo do desenho experimental das infecções microbianas.....	27
Figura 6 – Etapas da purificação do peptídeo recombinante.....	36
Figura 7 – Estrutura primária e sequência consenso da família das kammaricinas.....	38
Figura 8 – Assinatura aminoacídica e distribuição de KAM1 e KAM2 em camarões peneídeos.....	41
Figura 9 – Árvore filogenética resultante dos alinhamentos dos peptídeos maduros de KAM1 e KAM2 e árvore filogenética dos camarões peneídeos que apresentam KAM2.....	42
Figura 10 – Genes de kammaricinas nos <i>scaffolds</i> do genoma de <i>Litopenaeus vannamei</i>	43
Figura 11 – Organização gênica dos genes <i>KAM</i> do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	45
Figura 12 – Sequências dos diferentes pró-domínios de KAM1 e KAM2 de <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Penaeus monodon</i>	46
Figura 13 – Distribuição de expressão gênica de <i>Litvan KAM1</i> e <i>Litvan KAM2</i>	47
Figura 14 – Perfil transcricional de kammaricinas nos hemócitos circulantes de <i>Litopenaeus vannamei</i> após 48 horas de uma infecção por <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Fusarium solani</i> ou WSSV.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequências dos iniciadores utilizados neste estudo.....	30
Quadro 2 – Bactérias e condições de cultivo.....	32
Quadro 3 – Espectro de atividade antimicrobiana de <i>Litvan</i> rKAM1.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-DSC – *four-dissulfide core*

ALF – Fatores anti-lipopolissacarídeos

AMPs – Peptídeos antimicrobianos

APD – *The Antimicrobial Peptide Database*

Cq – Ciclo de quantificação

DAMPs – padrões moleculares associados a danos

dNTPs – Deoxinucleotídeos trifosfatados

DWD – Proteínas contendo dois domínios WAP

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

kDa – kilodaltons

pI – Ponto isoeletrico teórico

MAMPs – Padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs)

MAS – Solução de Alsever modificada

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RNAi – RNA de interferência

RT-PCR – Transcrição reversa seguida de PCR.

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

SWD – Proteínas contendo um domínio WAP

UFC – Unidades formadoras de colônia

WAP – *Whey Acidic Protein*

WSSV – Vírus da Síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Peptídeos antimicrobianos	14
1.2. Peneidinas	15
1.3. Fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)	17
1.4. Crustinas	19
1.5. Stylicinas.....	21
1.6. Potencial biotecnológico e prospecção de novos AMPs	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Prospecção de novos peptídeos antimicrobianos.....	26
3.2. Animais e coleta dos tecidos.....	26
3.3. Infecções experimentais	27
3.4. Extração de RNA e síntese de cDNA	27
3.5. Clonagem molecular e sequenciamento nucleotídico.....	28
3.6. Expressão heteróloga em sistema procarionte	30
3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	31
3.8. Análise das sequências e filogenia.....	32
3.9. Distribuição da expressão gênica.....	33
3.10. Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Prospecção molecular e análise funcional de novos AMPs em camarões peneídeos... 35	
4.2. Kammaricinas, uma nova família de AMPs exclusiva de camarões peneídeos	37
4.3. As kammaricinas formam uma família gênica diversa composta por dois membros ..	40
4.4. As kammaricinas são geradas a partir de diferentes genes e <i>splicing</i> alternativo	42
4.5. Distribuição da expressão gênica de <i>Litvan</i> KAM1 e <i>Litvan</i> KAM2	46
4.6. A expressão gênica das kammaricinas é altamente induzida nos hemócitos frente a infecções.....	48
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	52
5.1. Conclusão.....	52
5.2. Perspectivas	52
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de camarões ou carcinicultura é um setor econômico importante quanto ao suprimento de proteína animal para alimentação humana, sendo uma atividade mundialmente estabelecida. Além disso, essa atividade gera inúmeros empregos e movimenta um grande volume de capital em todo o mundo (FAO, 2020). Entre os camarões peneídeos cultivados mundialmente, o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, se destaca por suas características zootécnicas, sendo assim o mais cultivado (FAO, 2020). Porém, a crescente intensificação dos cultivos, associada a fatores ambientais estressantes, pode prejudicar o estado de saúde desses animais, deixando-os mais suscetíveis a doenças. Entre as principais doenças que podem acometer os cultivos, se destacam as causadas pelas bactérias Gram-negativas do gênero *Vibrio* e, principalmente, aquelas causadas por vírus (em especial o da Síndrome da Mancha Branca) (BOONCHUEN et al., 2018). Além desses, os camarões podem ser ainda acometidos por patógenos oportunistas, como os fungos do gênero *Fusarium*, que se manifestam quando a imunidade desses animais se encontra debilitada (COVARRUBIAS, 2004). Atualmente, os prejuízos econômicos causados por esses patógenos são um dos principais fatores limitantes para esse setor. Estima-se que os prejuízos causados por patógenos sejam de aproximadamente 1 bilhão de dólares globalmente (ASCHE et al., 2020). Em Santa Catarina, o surgimento do vírus Síndrome da Mancha Branca (WSSV) causou grande impacto na produção, o que levou ao fechamento de diversas fazendas no estado (SEIFFERT; COSTA; MAGGIONI, 2006).

Os camarões são desprovidos de sistema imune adaptativo composto por linhagens linfocíticas, anticorpos específicos e memória imunológica clássica, sendo dependentes apenas de um sistema imune do tipo inato. O sistema imune do tipo inato dos camarões está intimamente ligado ao seu tecido fluido, a hemolinfa. A hemolinfa é responsável pelo transporte de diversos componentes do sistema imunológico, como as células imunocompetentes, denominada de hemócitos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Os hemócitos são responsáveis pela maior parte das respostas de defesa, como as respostas celulares e humorais. Entre as respostas celulares mediadas pelos hemócitos estão a neutralização ou eliminação dos patógenos por fagocitose e a formação de nódulos, cápsulas e armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos. Em sinergismo com as respostas celulares, são ainda desencadeadas respostas humorais, como a ativação do sistema de pró-fenoloxidase (proPO), formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de moléculas citotóxicas, como os peptídeos antimicrobianos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

1.1. Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (*AntiMicrobial Peptides* ou AMPs) são importantes efetores do sistema imune que podem apresentar uma atividade direta ou indireta contra diferentes tipos de microrganismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras, fungos filamentosos e, em menor grau, contra protozoários e vírus envelopados (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004; GUANÍ-GUERRA et al., 2010). O primeiro AMP foi isolado da bactéria Gram-positiva *Brevibacillus brevisem* em 1939 (DUBOS, 1939). Inicialmente, essas moléculas apresentaram um potencial uso no meio clínico após serem utilizadas no tratamento de infecções cutâneas de porquinhos-da-índia (PHOENIX; DENNISON; HARRIS, 2013), mas o advento dos antibióticos em 1943 fez com que o interesse pelo uso terapêutico de AMPs fosse perdido (PHOENIX; DENNISON; HARRIS, 2013). Porém, o crescente surgimento de bactérias resistentes a antibióticos fez com que o interesse por essas moléculas ressurgisse e, conseqüentemente, milhares de AMPs têm sido caracterizados. De fato, mais de 3.000 AMPs foram depositados em bancos de dados especializados, como o *The Antimicrobial Peptide Database* ou APD (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Essa grande abundância é justificada, em parte, pelo fato de esses efetores estarem presentes em todos os Reinos dos seres vivos, desde bactérias até mamíferos. Geralmente, eles não possuem relação filogenética direta, sendo moléculas com funções biológicas análogas (DESTOUMIEUXGARZÓN et al., 2016).

Os AMPs são classicamente descritos como pequenas moléculas peptídicas (<10 kDa) de natureza anfipática, possuindo geralmente uma porção hidrofóbica e uma região hidrofílica de carga positiva (ROSA; BARRACCO, 2010). Eles possuem conformação e sequência aminoacídica variáveis, sendo classificados em quatro grandes classes: (1) peptídeos em α -hélice, (2) peptídeos cíclicos, ou cíclicos com extremidades abertas, que possuem ligações dissulfeto, (3) peptídeos ricos em um resíduo aminoacídico específico e (4) peptídeos não convencionais gerados a partir da hidrólise de moléculas precursoras (BULET; STOCKLIN; MENIN, 2004). Contudo, AMPs aniônicos e com massa superior a 10 kDa têm sido caracterizados, demonstrando que a definição clássica dessas moléculas não abrange toda a diversidade desse grupo de moléculas (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). O mecanismo clássico de ação dos AMPs tem como alvo principal a superfície celular dos microrganismos. Inicialmente, ocorre uma interação eletrostática entre a região catiônica do peptídeo e a membrana celular dos microrganismos, em geral carregada negativamente. Após a aproximação, a porção hidrofóbica da molécula se insere na bicamada lipídica causando a formação de poros e, conseqüentemente, o extravasamento do conteúdo intracelular

(BROGDEN, 2005). Além desse modo clássico de ação, essas moléculas podem atuar sobre outros alvos. Os AMPs podem ser interiorizados para atuar sobre componentes intracelulares, como ácidos nucleicos e proteínas, ou sobre a síntese dos mesmos (BROGDEN, 2005; HALE; HANCOCK, 2007). Além da sua função antimicrobiana, esses peptídeos podem desempenhar outras funções biológicas, como ação anti-inflamatória, antitumoral e na regeneração tecidual (AVILA, 2017).

Atualmente, 577 AMPs de artrópodes foram publicados no APD, dos quais 71 são de crustáceos. De acordo com assinaturas moleculares específicas, esses peptídeos de crustáceos estão divididos em 13 famílias, das quais cinco pertencem a camarões peneídeos (ROSA; BARRACCO, 2010). Dessas, uma é gerada a partir da hidrólise da hemocianina, a proteína carreadora de oxigênio presente no plasma de crustáceos (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2001). Em resposta a infecções, a hemocianina é processada liberando a sua extremidade C-terminal, a qual apresenta atividade antimicrobiana (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2001). As outras quatro famílias são codificadas por genes: peneidinas (DESTOUMIEUX et al., 1997), fatores anti-lipopolissacarídeos (GROSS et al., 2001), crustinas (BARTLETT et al., 2002) e stylicinas (ROLLAND et al., 2010).

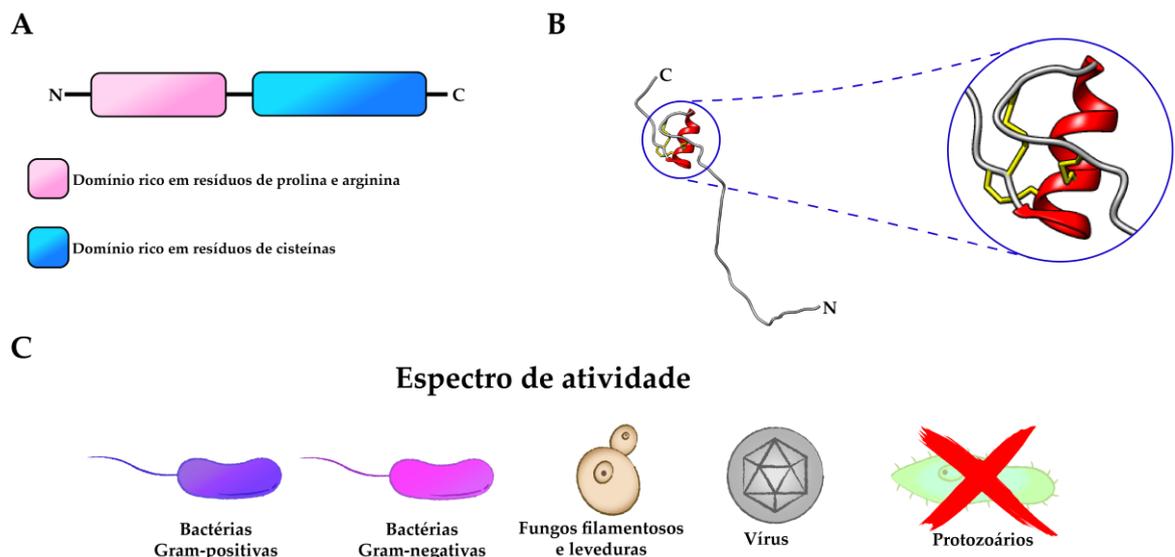
1.2. Peneidinas

As peneidinas (PEN) compõem a primeira família de AMPs identificada em camarões. Elas foram originalmente identificadas a partir da hemolinfa de *L. vannamei* (DESTOUMIEUX et al., 1997). Os membros dessa família, a qual é exclusiva de camarões peneídeos, são moléculas catiônicas que possuem um peptídeo sinal seguido por um peptídeo maduro (4,7 - 7,2 kDa) contendo um domínio N-terminal rico em resíduos de prolina e arginina e um domínio C-terminal contendo seis resíduos conservados de cisteína (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016;) (**Figura 1A**). Enquanto que o domínio N-terminal assume uma conformação linear, o domínio C-terminal assume uma estrutura bem definida que contém uma α -hélice anfipática e duas regiões em *coil* estabilizadas por três ligações dissulfeto (pareamento entre cisteínas: Cys₁₋₃Cys₂₋₅Cys₄₋₆) (**Figura 1B**) (YANG et al., 2003). Após a sua síntese, as peneidinas podem ainda sofrer modificações pós-traducionais, como a ciclização do resíduo de glutamina N-terminal em ácido piroglutâmico (pGlu) e a amidação da sua extremidade C-terminal (DESTOUMIEUX et al., 1997).

Classicamente, as peneidinas estão divididas em quatro subgrupos (PEN1/2, PEN3, PEN4 e PEN5) de acordo com assinaturas aminoacídicas próprias. Apesar de cada subgrupo ser codificado por um gene distinto, a organização estrutural desses genes é muito semelhante:

dois éxons separados por um íntron (WU et al., 2019). Os membros dessa família não estão distribuídos em todas as espécies de camarões peneídeos, sendo espécie-específicos (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). Enquanto que o gene *PEN3* está presente na maioria das espécies, os genes *PEN1/2* e *PEN4* foram identificados apenas nos gêneros *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus* e o gene *PEN5* parece estar restrito aos gêneros *Penaeus* e *Fenneropenaeus* (TASSANAKAJON et al., 2011). Recentemente, foi identificada uma PEN em *Marsupenaeus japonicus* que possui as características das demais peneídeínas, mas com uma região adicional rica em resíduos de serina na extremidade N-terminal (AN et al., 2016). Por fim, um novo membro capaz de interagir com proteínas do envelope do WSSV foi identificado em *L. vannamei* e denominado de BigPEN. Diferente das demais peneídeínas, a BigPEN apresenta um domínio de repetição na sua extremidade N-terminal (XIAO et al., 2020).

Figura 1. Características estruturais e espectro de atividade das peneídeínas.



(A) Desenho esquemático da estrutura primária do peptídeo maduro das peneídeínas. As regiões N- e C-terminal estão sendo representadas por N e C, respectivamente. (B) Estrutura terciária de Litvan PEN3 de *Litopenaeus vannamei* (PDB: 1UEO). A α -hélice está destacada em vermelho e as ligações dissulfeto em amarelo (Cys₁₋₃Cys₂₋₅Cys₄₋₆). (C) Representação do espectro de atividade antimicrobiana das peneídeínas. Essa família apresenta atividade contra os microrganismos destacados. Os microrganismos sobrepostos por “X” indicam que as peneídeínas não possuem atividade contra as espécies de protozoários testadas.

A ampla diversidade das peneídeínas se reflete no seu amplo espectro de atividade antimicrobiana (Figura 1C). Enquanto que as peneídeínas dos subgrupos PEN1/2, PEN3 e PEN4 apresentam atividade majoritariamente contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos, as peneídeínas do subgrupo PEN5 apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). O subgrupo PEN3 também apresenta atividade antiviral, sendo capaz de reduzir a replicação viral (CARRIEL-GOMES et al., 2007).

Finalmente, diversos subgrupos de peneidinas parecem estar envolvidos com as defesas antivirais de camarões peneídeos *in vivo* (WORAMONGKOLCHAI; SUPUNGUL; TASSANAKAJON, 2011; XIAO et al., 2020). O silenciamento pós-transcricional de PEN1/2, PEN3, PEN4, PEN5 e BigPEN pela técnica de RNA de interferência (RNAi) levou ao aumento do número de partículas virais de WSSV em camarões peneídeos (WORAMONGKOLCHAI; SUPUNGUL; TASSANAKAJON, 2011; XIAO et al., 2020). PEN3 foi avaliada contra protozoários de interesse clínico, mas não demonstrou atividade antiparasitária (LÖFGREN et al., 2008). Além da sua função antimicrobiana, as peneidinas também parecem estar associadas a outros processos fisiológicos, como regeneração tecidual e ecdise (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). As peneidinas são expressas e armazenadas nos grânulos citoplasmáticos de hemócitos granulares e semi-granulares (BACHÈRE et al., 2004). Frente a desafios microbianos, as peneidinas armazenadas são liberadas nos sítios de infecção para combater os patógenos (DESTOUMIEUX et al., 2000; MUÑOZ et al., 2002).

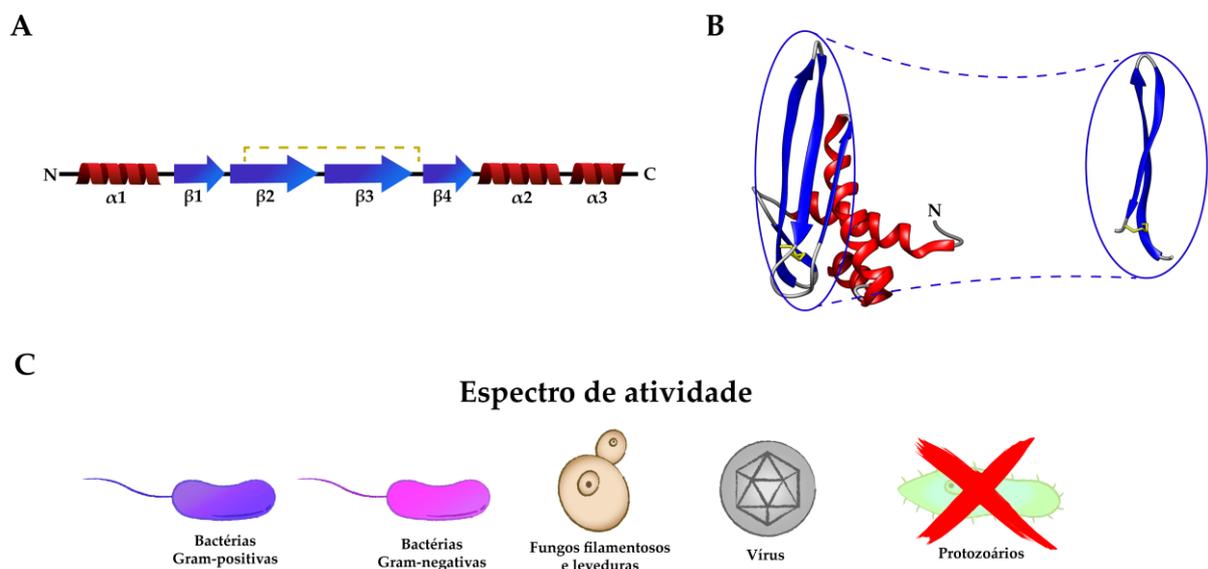
1.3. Fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)

Diferente das peneidinas, os fatores anti-lipopolissacarídeos (anti-LPS ou ALFs) não são exclusivos de camarões peneídeos, estando presentes em quelicerados marinhos e em outros crustáceos (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). Eles foram originalmente identificados a partir da hemolinfa dos limulídeos *Limulus polyphemus* e *Tachypleus tridentatus* (TANAKA et al., 1982). Os ALFs foram caracterizados como moléculas com capacidade anticoagulante (TANAKA et al., 1982), mas ensaios posteriores demonstraram que essas moléculas também apresentavam atividade antimicrobiana (MORITA et al., 1985). Em crustáceos, a família dos ALFs foi inicialmente identificada no camarão *L. setiferus*, a partir da construção e análise de bancos de genes expressos em hemócitos (GROSS et al., 2001).

Essa família de AMPs é composta por peptídeos catiônicos e aniônicos que apresentam um peptídeo sinal seguido por um peptídeo maduro que apresenta uma região N-terminal hidrofóbica e dois resíduos de cisteínas engajados em uma ponte dissulfeto. A região delimitada pelas cisteínas assume uma conformação em formato de grampo (*β -hairpin*) (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). O domínio *β -hairpin* está essencialmente envolvido no reconhecimento e ligação a componentes da superfície de microrganismos, como lipopolissacarídeos (LPS), ácido teicoico e β -glicanas (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). Interessantemente, peptídeos contendo apenas a região *β -hairpin* apresentam atividade antimicrobiana similar aos peptídeos inteiros, destacando a relevância dessa região (JIANG et al., 2015; NAGOSHI et al., 2006; ROSA et al., 2013). Até o momento, apenas as

estruturas de L-ALF de *L. polyphemus* (HOESS et al., 1993) e de ALFPm3 de *Penaeus monodon* (YANG et al., 2009) foram resolvidas. Essas moléculas apresentam conformações conservadas, contendo uma α -hélice na extremidade N-terminal ($\alpha 1$) seguida por quatro folhas- β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$) e, finalmente, duas α -hélices ($\alpha 2$ e $\alpha 3$) na extremidade C-terminal (**Figura 2A e 2B**) (HOESS et al., 1993; YANG et al., 2009). Essas estruturas secundárias apresentam tamanhos distintos, sendo $\alpha 1$ e $\alpha 2$ maiores que $\alpha 3$ e $\beta 2$ e $\beta 3$ maiores que $\beta 1$ e $\beta 4$ (**Figura 2A e 2B**).

Figura 2. Características estruturais e espectro de atividade dos ALFs.



(A) Desenho esquemático da estrutura primária do peptídeo maduro dos ALFs. As α -hélices estão destacadas em vermelho, as folhas- β em azul e as ligações dissulfeto em amarelo. As regiões N- e C-terminal estão sendo representadas por N e C, respectivamente. (B) Estrutura terciária de ALFPm3 de *P. monodon* completo (esquerda) e do seu domínio β -hairpin (direita) (PDB: 2JOB). (C) Representação do espectro de atividade antimicrobiana dos ALFs. Essa família apresenta atividade contra os microrganismos destacados. Os microrganismos sobrepostos por “X” indicam que os ALFs não possuem atividade contra as espécies de protozoários testadas.

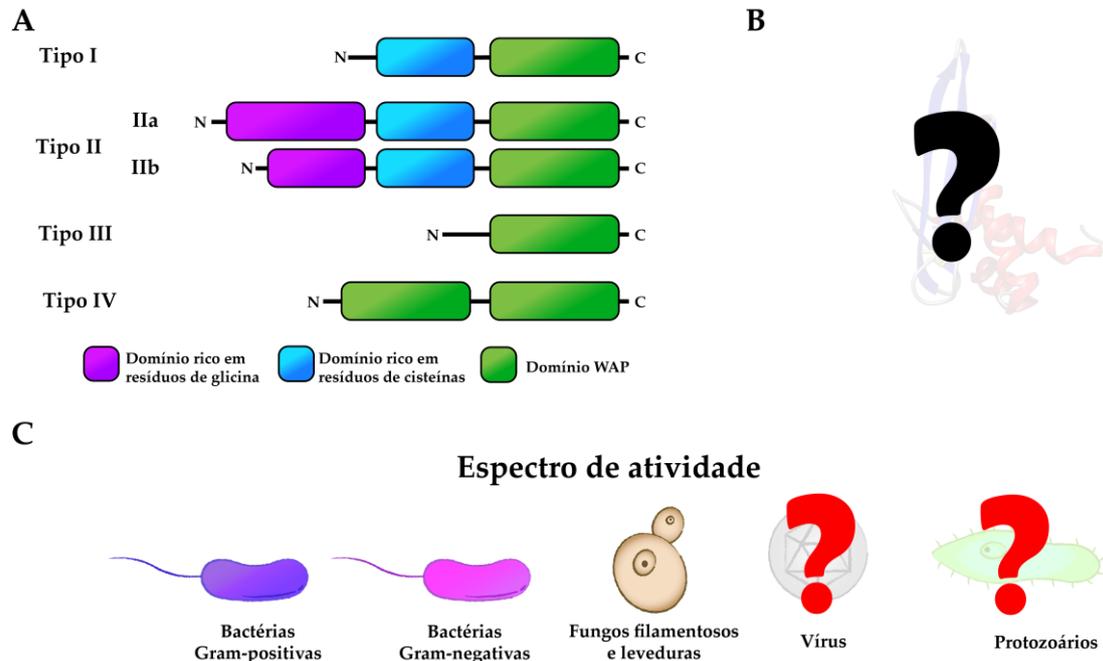
Em camarões peneídeos, os ALFs compreendem uma família muito diversa, sendo dividida em sete membros (Grupos ALF-A a ALF-G) de acordo com assinaturas aminoacídicas próprias (MATOS et al., 2018). Outro fator que difere esses Grupos é a sua carga: enquanto que os ALFs dos Grupos A, D, E e G são aniônicos ($pI = 5,02 - 7,09$), os demais Grupos (B, C e F) são catiônicos ($pI = 7,98 - 10,29$). Os ALFs compõem uma família multigênica na qual cada membro é codificado por um gene. Apesar de serem codificados por genes distintos, esses genes compartilham de uma organização estrutural semelhante, sendo compostos por três éxons separados por dois íntrons (MATOS et al., 2018). Diferentemente das peneidinas, os membros de ALFs não são espécie-específicos. Os sete membros de ALFs estão amplamente distribuídos entre as espécies de camarões peneídeos, sugerindo que a diversificação dessas moléculas

ocorreu antes da especiação dessas espécies (MATOS et al., 2018). Os ALFs apresentam um amplo espectro de atividade devido à capacidade da região β -hairpin reconhecer diferentes componentes microbianos (MATOS et al., 2018). Os membros dessa família apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos e vírus envelopados (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). A atividade antimicrobiana de ALFPm3 também foi avaliada contra protozoários de interesse clínico, mas essas moléculas não demonstraram atividade antiparasitária (LÖFGREN et al., 2008). Os ALFs possuem um papel primordial no controle da microbiota presente na hemolinfa de camarões, uma vez que seu silenciamento pós-transcricional leva a proliferação da microbiota, resultando na morte desses animais (PONPRATEEP et al., 2012; WANG et al., 2014). Assim como as peneidinas, os ALFs também são expressos nos hemócitos circulantes. Contudo, algumas evidências indicam que alguns membros dessa família também são expressos em outros tecidos, como o trato gastrointestinal (MATOS et al., 2018)

1.4. Crustinas

As crustinas foram originalmente identificadas a partir dos hemócitos do caranguejo *Carcinus maenas* como um peptídeo antibacteriano de 11,5 kDa (RELF et al., 1999). Posteriormente, homólogos do peptídeo de *C. maenas* foram identificados e caracterizados em camarões peneídeos e o termo crustina foi estabelecido para essa família (BARTLETT et al., 2002). Elas compõem uma família de AMPs majoritariamente catiônicos que possuem um peptídeo sinal seguido por um peptídeo maduro que contém, pelo menos, um domínio WAP (*Whey Acidic Protein*) em sua extremidade C-terminal (**Figura 3A**) (SMITH et al., 2008). Esse domínio possui cerca de 50 resíduos aminoácídicos, dos quais oito são resíduos conservados de cisteína. Esses resíduos conservados de cisteína estão engajados em quatro ligações dissulfeto, formando uma estrutura chamada de *four-dissulfide core* (4 DSC) (RANGANATHAN et al., 1999). O domínio WAP é característico da família das crustinas, mas não é exclusivo desses AMPs, estando presente em outras classes de proteínas expressas em nematódeos, moluscos e, principalmente, em mamíferos (SMITH, 2011). Apesar de as estruturas tridimensionais de proteínas contendo o domínio WAP terem sido resolvidas (GRÜTTER et al., 1988; TSUNEMI et al., 1996), a conformação tridimensional das crustinas ainda não foi determinada (**Figura 3B**).

Figura 3. Características estruturais e espectro de atividade das crustinas.



(A) Desenho esquemático da estrutura primária dos peptídeos maduros das crustinas. As regiões N- e C-terminal estão sendo representadas por N e C, respectivamente. (B) A conformação tridimensional desconhecida das crustinas está sendo representada por uma estrutura terciária não relacionada sobreposta por "?". (C) Representação do espectro de atividade antimicrobiana das crustinas. Essa família apresenta atividade contra os microrganismos destacados. O símbolo "?" indica que a atividade contra os microrganismos sobrepostos não foi avaliada.

As crustinas estão divididas em quatro grupos, denominados de Tipos I a IV (Figura 3A). Esses grupos são classificados de acordo com a presença ou ausência de determinados domínios entre a extremidade N-terminal e o domínio WAP do peptídeo maduro (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). As crustinas do Tipo I apresentam um domínio rico em resíduos de cisteínas (4 resíduos) na extremidade N-terminal e um único domínio WAP na extremidade C-terminal (Figura 3A). As crustinas do Tipo II são semelhantes às do Tipo I, mas elas também possuem um domínio hidrofóbico rico em resíduos de glicina na extremidade N-terminal (Figura 3A). Além disso, as crustinas do Tipo II podem ser divididas em dois subtipos (IIa e IIb) de acordo com assinaturas aminoacídicas específicas (BARRETO et al., 2018). Diferente das crustinas do Tipo I e II, as crustinas do Tipo III não apresentam domínios na região N-terminal, sendo caracterizadas por possuírem apenas o domínio WAP (Figura 3A). Por essa razão, elas também são conhecidas como *Single WAP domain-containing proteins* (SWD). As crustinas do Tipo IV, por sua vez, apresentam dois domínios WAP, sendo chamadas de *Double WAP domain-containing proteins* (DWD).

Os membros dessa família apresentam atividade antimicrobiana majoritariamente contra bactérias Gram-positivas, mas também contra bactérias Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2016). Apesar de apresentar

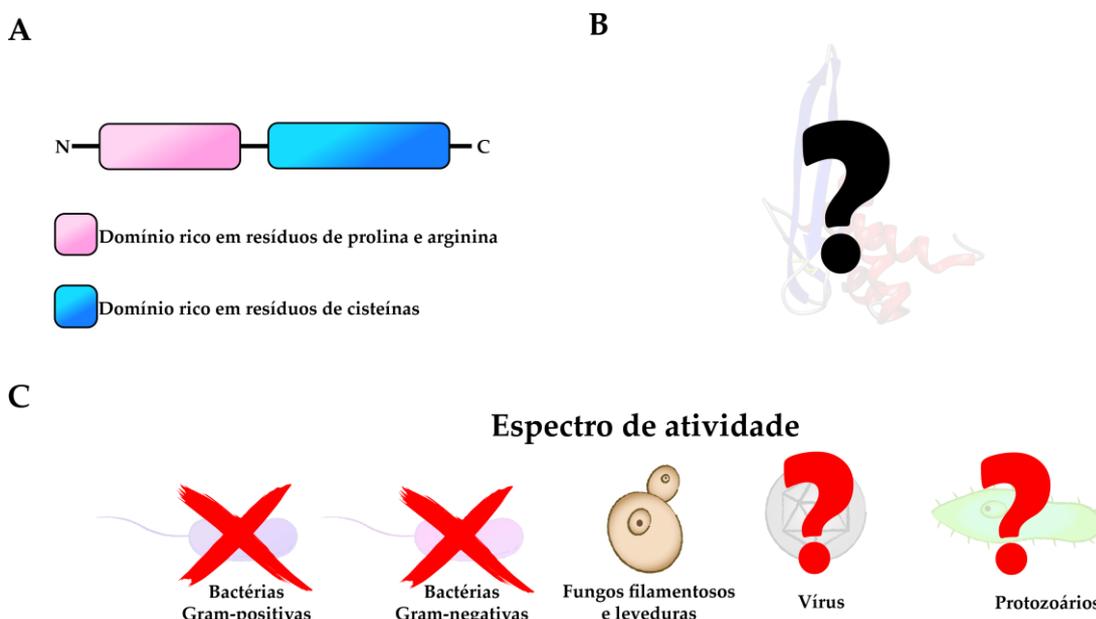
baixa atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias Gram-negativas, estudos *in vivo* mostraram o envolvimento desses efetores nas respostas contra bactérias do gênero *Vibrio* (SHOCKEY et al., 2009). As crustinas possuem outras funções biológicas além da atividade antimicrobiana, sendo AMPs multifuncionais que possuem atividade antiproteolítica e que estão envolvidos na aglutinação de bactérias, regeneração tecidual, ecdise e estresse fisiológico (SMITH, 2011). Em camarões peneídeos, as crustinas são expressas majoritariamente nos hemócitos granulares e semi-granulares. Interessantemente, apenas 50% dos hemócitos granulares e semi-granulares do camarão *Farfantepenaeus paulensis* produzem crustinas do Tipo II, indicando que essas moléculas são produzidas por subpopulações específicas (BANDEIRA et al., 2020).

1.5. Stylicinas

A família das stylicinas foi caracterizada em 2010, sendo a última família descrita em camarões peneídeos e a menos estudada (ROLLAND et al., 2010). Elas foram identificadas a partir de um estudo transcritômico que identificou um painel de genes associados à capacidade de camarões (*Litopenaeus stylirostris*) de sobreviverem a infecções bacterianas (DE LORGERIL et al., 2005). Essas moléculas são compostas por peptídeos exclusivamente aniônicos que possuem um peptídeo sinal seguido por um peptídeo maduro contendo uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e arginina e uma região C-terminal com 13 resíduos conservados de cisteína (**Figura 4A**) (ROLLAND et al., 2010). Assim como as crustinas, as stylicinas não tiveram a sua estrutura tridimensional resolvida (**Figura 4B**).

Essa família é exclusiva de camarões peneídeos, tendo sido identificada apenas nos camarões *L. stylirostris*, *M. japonicus*, *L. vannamei*, *Fenneropenaeus penicillatus* e *P. monodon* (FARIAS et al., 2019). Enquanto que apenas um membro das stylicinas foi identificado nos gêneros *Marsupenaeus*, *Fenneropenaeus* e *Penaeus*, o gênero *Litopenaeus* apresenta dois membros: STY1 e STY2. É provável que STY1 e STY2 sejam genes parálogos que surgiram a partir de um evento de duplicação gênica antes da especiação do gênero *Litopenaeus* (FARIAS et al., 2019). Além disso, o número de cópias gênicas de STY1 e STY2 é variável em *L. vannamei*, sugerindo que esses membros sofreram eventos de duplicação independentes após a divergência entre STY1 e STY2 (FARIAS et al., 2019). Apesar disso, as stylicinas identificadas nos gêneros *Litopenaeus*, *Penaeus* e *Marsupenaeus* apresentam uma estrutura gênica semelhante: dois éxons separados por um íntron (FARIAS et al., 2019).

Figura 4. Características estruturais e espectro de atividade das stylicinas.



(A) Desenho esquemático da estrutura primária dos peptídeos maduros das stylicinas. As regiões N- e C-terminal estão sendo representadas por N e C, respectivamente. (B) A conformação tridimensional desconhecida das stylicinas está sendo representada por uma estrutura terciária não relacionada sobreposta por “?” (C) Representação do espectro de atividade antimicrobiana das stylicinas. Essa família apresenta atividade contra os microrganismos destacados. Os microrganismos sobrepostos por “X” ou “?” indicam que as stylicinas não possuem atividade contra as espécies de bactérias testadas ou a atividade não foi avaliada, respectivamente.

Até o momento, a atividade antimicrobiana das stylicinas foi avaliada apenas contra fungos e bactérias, apresentando atividade restrita contra o fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* (Figura 4C) (ROLLAND et al., 2010). Apesar disso, essas moléculas também apresentam capacidade de ligação a LPS e de aglutinação de bactérias Gram-negativas (ROLLAND et al., 2010), sugerindo um envolvimento nas respostas de defesas *in vivo*. Assim como as outras famílias de AMPs de camarões peneídeos, a expressão das stylicinas é detectada majoritariamente nos hemócitos circulantes (LIU et al., 2015). Contudo, as stylicinas também são expressas nas células epiteliais do intestino médio de camarões, sendo esse o único registro de AMPs de camarões peneídeos produzidos em outras células além dos hemócitos (FARIAS et al., 2019). A produção das stylicinas por células do intestino médio sugere uma participação desses efetores nas respostas intestinais de defesa de camarões (FARIAS et al., 2019).

1.6. Potencial biotecnológico e prospecção de novos AMPs

Os AMPs se destacam como moléculas com potencial biotecnológico devido ao seu amplo espectro de atividade, sua diversidade e suas propriedades multifuncionais (GUANÍ-GUERRA et al., 2010). Além disso, o mecanismo de ação dessas moléculas sobre componentes fundamentais das bactérias torna o surgimento de microrganismos resistentes menor (GUANÍ-

GUERRA et al., 2010). Apesar disso, o surgimento de microrganismos resistentes a AMPs é possível através do desenvolvimento de mecanismos complexos de resistência, os quais, em alguns casos, podem ser contornados pela modificação de resíduos aminoacídicos específicos dos AMPs (BECHINGER; GORR, 2017). Nesse sentido, essas moléculas podem ser usadas como uma alternativa aos antibióticos convencionais para combater microrganismos resistentes, que são um grande problema de saúde pública mundial (MCKENNA, 2013). Além disso, os AMPs podem ser utilizados como marcadores moleculares para a seleção de animais mais resistentes a infecções microbianas. Portanto, o estudo dessas moléculas se torna interessante especialmente em organismos que movimentam um grande volume de capital, como os camarões peneídeos.

Novos AMPs podem ser identificados por diferentes abordagens. A principal abordagem para a identificação de novas famílias de AMPs consiste na identificação dessas moléculas a partir de extratos proteicos com atividade antimicrobiana (SPERSTAD et al., 2011). Uma vez que o peptídeo é isolado do extrato proteico, ele pode ser sequenciado por diferentes métodos bioquímicos e comparado com bancos de dados existentes. Contudo, essas técnicas podem ser muito laboriosas (AMARAL et al., 2012) e a identificação por essa abordagem pode ser afetada por múltiplos fatores, como variações geográficas e sazonais, diferença nos estágios de vida, sexo do organismo e status fisiológico dos organismos (SPERSTAD et al., 2011). Além disso, a concentração dessas moléculas pode ser muito baixa em algumas espécies (SPERSTAD et al., 2011) e, conseqüentemente, é preciso uma grande quantidade de organismos para se obter quantidades suficientes de peptídeos (PETTIT et al., 1987).

Alternativamente, AMPs conhecidos podem ser usados para a identificação de sequências homólogas em bancos de dados não anotados, como o *Expressed Sequence Tags (ESTs) database* (BARTLETT et al., 2002; GROSS et al., 2001). Essa abordagem é a mais utilizada atualmente devido a sua facilidade e alta taxa de sucesso (PATRZYKAT; DOUGLAS, 2003; SPERSTAD et al., 2011). A busca por sequências homólogas tem expandido muito as famílias conhecidas de AMPs, aumentando o conhecimento sobre a diversidade dessas moléculas e revelando os seus domínios conservados. Essa abordagem pode aumentar o conhecimento sobre as famílias existentes, mas dificilmente irá revelar famílias nunca descritas (SPERSTAD et al., 2011). Outra alternativa promissora é a identificação de novos AMPs através de análises computacionais (FINGERHUT et al., 2020). Esses softwares analisam bancos de dados a procura de potenciais AMPs, baseando-se nas características físico-químicas de AMPs previamente descritos na literatura (AMARAL et al., 2012). Uma vez que as

principais características dos AMPs são conhecidas, a busca dessas semelhanças através de análises *in silico* é uma abordagem que pode abreviar a identificação e caracterização de novas famílias de AMPs (AMARAL et al., 2012).

Devido ao seu potencial biotecnológico, um grande número de AMPs foram caracterizados, contudo, até mesmo a grande diversidade conhecida de AMPs parece demonstrar que a variedade dessas moléculas é, possivelmente, muito maior (LAZZARO; ZASLOFF; ROLFF, 2020). Isso pode ser ilustrado pelo fato de que apenas 16% dos AMPs descritos pertencem aos artrópodes, apesar de os artrópodes constituírem mais de 60% das espécies do planeta (LAZZARO; ZASLOFF; ROLFF, 2020). Dito isso, apenas quatro famílias de AMPs codificadas por genes foram identificadas em camarões peneídeos, mas a busca por novas famílias é fundamental nesse grupo, uma vez que o entendimento do sistema imune desses animais pode auxiliar na carcinicultura e no desenvolvimento de antibióticos alternativos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a identificação e a caracterização molecular e funcional de uma nova família de peptídeos antimicrobianos de camarões peneídeos.

2.2. Objetivos específicos

- Prospectar potenciais novos AMPs em bancos transcritômicos de camarões peneídeos;
- Determinar o espectro de atividade antimicrobiana de peptídeos produzidos em sistema recombinante;
- Realizar a caracterização molecular das sequências obtidas (genes e transcritos) e definir suas relações filogenéticas;
- Determinar a distribuição da expressão gênica nos diferentes tecidos de camarões juvenis;
- Caracterizar o perfil transcricional frente a infecções por patógenos de interesse aquícola.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Prospecção de novos peptídeos antimicrobianos

A prospecção de potenciais novos AMPs foi realizada através de buscas por sequências sem anotação gênica e com função desconhecida provenientes de um estudo transcritômico que identificou um painel de genes associados à capacidade de camarões (*L. stylirostris*) de sobreviverem a infecções bacterianas (DE LORGERIL et al., 2005). Para isso, as sequências aminoacídicas deduzidas recuperadas desse estudo foram analisadas no programa CAMP_{R3} (<http://camp.bicnirrh.res.in/predict/>) utilizando os algoritmos SVM, *random forest*, *artificial neural network* e *discriminant analysis*. As sequências também foram analisadas utilizando a ferramenta de predição de AMPs do *Antimicrobial Peptide Database* (APD). Esses programas analisam as sequências quanto à presença de propriedades moleculares inerentes a AMPs clássicos, como baixa massa molecular (até 15 kDa) e cationicidade, presença de componentes estruturais típicos (peptídeo sinal e pró-domínios, estrutura secundária em alfa-hélice e presença de determinadas assinaturas aminoacídicas) e o potencial de interação com componentes microbianos.

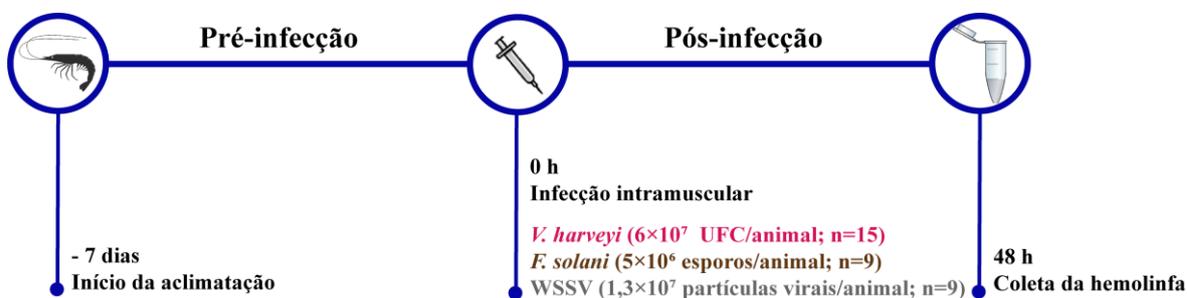
3.2. Animais e coleta dos tecidos

Neste trabalho foram utilizados camarões juvenis (10 ± 1 g) da espécie *L. vannamei*, os quais foram cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC/CCA/LCM). Os animais foram mantidos em aquários contendo aproximadamente 100 L de água salgada, com aeração constante e com renovação diária da água de 50%. A temperatura da água foi mantida em 26 °C e os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial. Os animais foram aclimatados por um período mínimo de sete dias antes da realização dos experimentos. Para obtenção dos hemócitos, a hemolinfa foi extraída na presença de solução anticoagulante (Solução de Alsever Modificada ou MAS: 115 mM glicose, 336 mM NaCl, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2), centrifugada ($800 \times g$ por 10 min a 4 °C) e o precipitado celular resultante suspenso em 1 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, os camarões foram sacrificados para coleta dos seguintes tecidos/órgãos: brânquias, hepatopâncreas, estômago, intestino médio, intestino posterior, músculo, cordão nervoso e pedúnculo ótico. As amostras foram lavadas em solução Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4) e maceradas na presença de 1 mL de TRIzol.

3.3. Infecções experimentais

As infecções experimentais foram realizadas com três patógenos de interesse aquícola: a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi*, o fungo filamentosso *Fusarium solani* e o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (**Figura 5**). Para a infecção bacteriana, os animais foram injetados intramuscularmente com 100 μL de um inóculo contendo 6×10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Vibrio harveyi* ATCC 14126. Como controle da infecção bacteriana, foram utilizados animais injetados com água do mar filtrada. Para a infecção fúngica, os animais foram injetados intramuscularmente com 50 μL de um inóculo contendo 5×10^6 esporos de *F. solani*. Como controle dessa infecção, foram utilizados animais injetados com solução Tris-NaCl filtrada. Finalmente, para a infecção viral, os animais foram injetados intramuscularmente com 50 μL de um inóculo contendo $1,3 \times 10^7$ partículas do WSSV. Como controle da infecção viral, foram utilizados animais injetados com 50 μL de um macerado muscular de camarões livres de WSSV. Após o período de 48 h, a hemolinfa dos animais (3 *pools* por condição) foi extraída e os hemócitos foram utilizados para extração de RNA total e síntese de cDNA. Para todas as condições experimentais, foram utilizados como controle animais não manipulados (grupo *naïve*).

Figura 5. Esquema ilustrativo do desenho experimental das infecções microbianas.



A linha temporal não apresenta uma escala de tempo real.

3.4. Extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras conservadas em TRIzol foram submetidas à extração com clorofórmio e isopropanol. Foi adicionado clorofórmio às amostras (1:5, v/v) que foram agitadas vigorosamente por inversão. Então, as amostras foram incubadas por 3 min à temperatura ambiente, centrifugadas ($12.000 \times g$ por 15 min a 4°C) e a fase líquida contendo o RNA total foi transferida para um novo microtubo. O RNA total foi precipitado com isopropanol (1:1, v/v), lavado com etanol 75% e suspenso em água livre de DNases/RNases. Para eliminação de DNA sobressalente, as amostras foram incubadas com 1 U da enzima DNase I (Thermo

Fisher Scientific) por 30 min a 37 °C. A enzima foi inativada a 65 °C por 10 min na presença de 4,5 mM EDTA e as amostras foram precipitadas com acetato de sódio (0,3 M, pH 5,5) e isopropanol (1:1, v:v). A quantificação e análise de pureza das amostras de RNA total foi avaliada por espectrofotometria (NanoVue Plus) e a integridade foi confirmada em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio.

Finalmente, o RNA foi reversamente transcrito em cDNA utilizando a enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Para isso, reações de 20 µL contendo 1 µg de RNA total e 0,5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ foram incubadas por 5 min a 65 °C e, em seguida, por 2 min a 4 °C. Então, foi adicionado às reações 200 U da RevertAid Reverse Transcriptase, 0,5 mM de dNTP Mix e 20 U da enzima RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific). As amostras foram incubadas a 42 °C por 60 min e a enzima inativada a 65 °C por 15 min.

3.5. Clonagem molecular e sequenciamento nucleotídico

Para a clonagem molecular, foram realizadas reações de transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR). As reações de RT-PCR foram realizadas num volume de 15 µL contendo 2 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP Mix, 0,2 µM dos iniciadores específicos para *Litvan* KAM1 (**Quadro 1**), 1 U da enzima Taq DNA polymerase (Sinapse Inc) e 1 µL de cDNA de hemócitos. As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 s, hibridização a 58 °C por 45 s, extensão a 72 °C por 30 s e extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de amplificação foram avaliados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio. Os produtos de amplificação de tamanho esperado foram ligados ao vetor pCR 2.1-TOPO TA (Thermo Fisher Scientific). A reação de ligação foi feita em um volume final de 6 µL contendo 1 µL de produto de reação e 10 ng do plasmídeo pCR 2.1-TOPO TA. As reações foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente.

Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para a transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α cálcio-competentes por choque térmico (42 °C por 45 s, seguido de uma incubação no gelo por 2 min). Em seguida, as bactérias foram incubadas sob agitação em meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*: 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,05% NaCl, 250 mM KCl, 2 M MgCl₂, 20 mM glicose, pH 7,2) por 90 min a 37 °C. Após incubação, 200 µL da suspensão bacteriana foram semeados em meio LB (*Lysogenic Broth*: 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,2) acrescido de ágar (15 g/L), contendo ampicilina (50 µg/mL) e X-GAL (20 µg/mL). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C.

Então, colônias de coloração branca foram selecionadas para confirmação do inserto no plasmídeo por PCR-colony. As reações de PCR-colony foram realizadas em um volume final de 10 μ L contendo esfregaço bacteriano, 2 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTP Mix, 0,2 μ M dos iniciadores M13 (Promega) e 1 U da enzima Taq DNA polymerase (Sinapse Inc). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 15 min, seguida 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. Os plasmídeos positivos para o inserto foram submetidos à extração utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) e, posteriormente, suspensos em água livre de DNases/RNases. Por fim, a quantificação e análise de pureza dos plasmídeos foi avaliada por espectrofotometria (NanoVue Plus).

Os plasmídeos contendo o inserto de interesse foram sequenciados em ambas as direções pelo método de Sanger. Para isso, foram preparadas reações com um volume final de 10 μ L, contendo 1 μ L do reagente BigDye Terminator (Thermo Fisher Scientific), 1,5 μ L do tampão de sequenciamento 5 \times (Thermo Fisher Scientific), 5 μ M do iniciador M13 senso ou antissenso (Promega) e 700 ng de plasmídeo. As reações de sequenciamento foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96 °C por 10 s, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 s, hibridização a 50 °C por 5 s e extensão a 60 °C por 4 min. Então, os produtos das reações foram precipitados em etanol e as sequências nucleotídicas foram determinadas.

Um dos plasmídeos recombinantes, contendo a sequência de interesse (sequência correspondente ao peptídeo maduro de *Litvan KAM1*), foi subclonado no plasmídeo pET-28a (Novagen). Para isso, o plasmídeo recombinante e o vetor pET-28a foram linearizados com as enzimas de restrição NdeI e NheI (Thermo Fisher Scientific). As reações de linearização foram feitas em um volume final de 20 μ L contendo 1 \times do tampão Tango (Thermo Fisher Scientific), 1 U de cada enzima de restrição e 2 μ g de plasmídeo. As reações foram incubadas a 37 °C por 1 h e, após linearização, as enzimas foram inativadas a 65 °C por 20 min. O inserto foi purificado após eletroforese em gel de agarose e o inserto e o vetor pET-28a foram ligados através de uma reação de ligação. A reação foi realizada em um volume final de 10 μ L contendo 50 ng do plasmídeo pET-28a, 50 ng do inserto purificado e 3 U da enzima T4 DNA Ligase, sendo que a reação foi incubada *overnight* a 4 °C. Então, o plasmídeo pET-28a contendo a sequência de interesse foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* BL21 (DE3) por choque térmico. Essas bactérias foram selecionadas em meio LB contendo canamicina (50 μ g/mL) e a técnica de PCR-colony foi efetuada para confirmar a presença do inserto no

plasmídeo, o qual foi extraído por lise alcalina e sequenciado em ambas as direções, conforme descrito anteriormente.

Quadro 1. Sequências dos iniciadores utilizados neste estudo.

Gene	Referência	Iniciadores 5'- 3'	Amplicon	Eficiência
Expressão recombinante				
<i>Litvan KAM1</i>	Presente estudo	S: <u>CATATGCAGTTCTCTTGGTCAAGCAAC</u> AS: <u>GCTAGCTCATCACTTGCCAGTCACA</u>	330 pb	-
Análises de expressão gênica				
<i>LvActin</i> ¹	WANG; CHANG; CHEN, 2007	S: TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG AS: TCACCAACTGGGATGACATGG	846 pb	-
<i>LvActin</i> ²	WANG; CHANG; CHEN, 2007	S: CCACGAGACCACCTACAAC AS: AAGCGAGGGCAGTGATTTC	142 pb	98,3%
<i>LvEF1α</i> ²	DE LA VEGA et al., 2008	S: TGGCTGTGAACAAGATGGACA AS: ATTGTAGCCACCTTCTTGACG	103 pb	97,2%
<i>LvRpS6</i> ²	GONCALVES et al., 2014	S: AGCAGATACCCTTGGTGAAG AS: AGATGCAACCACGGACTGAC	193 pb	98,8%
<i>LvRpS3A</i> ²	DE LA VEGA et al., 2008	S: GGCTTGCTATGGTGTGCTCC AS: ATCATGCTCTTGGCTCGCTG	101 pb	97,4%
<i>Litvan KAM1</i> ^{1,2}	Presente estudo	S: GATGTTCTGGCGGTGGTC AS: GTCCACCGTATTGCTCTACA	134 pb	98,6%
<i>Litvan KAM2</i> ^{1,2}	Presente estudo	S: GATGTTCTGGCGGTGGTC AS: TTCTCCACCGATTTGTGTATG	166 pb	100%

O sublinhado indica os sítios de restrição das enzimas NdeI (iniciador senso) e NheI (iniciador antissenso).

¹Iniciadores para as análises de distribuição da expressão gênica por RT-PCR.

²Iniciadores para as análises de expressão gênica por RT-qPCR.

S: iniciador senso; AS: iniciador antissenso.

3.6. Expressão heteróloga em sistema procarionte

As bactérias *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo recombinante foram cultivadas em 3,5 L de meio LB a 37 °C até atingirem uma densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0,5 e 0,6. Então, a expressão heteróloga foi induzida com 1 mM de IPTG (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) e a suspensão bacteriana foi mantida sob agitação por 4 h a 37 °C. As bactérias foram centrifugadas (10.000 ×g por 20 min a 4 °C), o sobrenadante descartado e o precipitado bacteriano suspenso em 70 mL de tampão de lise (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 6 M cloreto de guanidina e 5 mM imidazol, pH 9). Após sonicação com amplitude de 40% (três repetições de 30 s com 1 min de intervalo), o peptídeo recombinante foi purificado por cromatografia de afinidade metálica usando agarose Ni-NTA (QIAGEN). Para isso, 7 mL de agarose Ni-NTA (QIAGEN) foram adicionados à amostra que ficou sob agitação *overnight*

a 4 °C. Após período de incubação, a amostra foi centrifugada (800 ×g por 2 min), o sobrenadante descartado e 20 mL de tampão de lavagem (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 6 M cloreto de guanidina e 5 mM imidazol, pH 9) foram adicionados à amostra, a qual ficou sob agitação por 2 min à temperatura ambiente. Após lavagem, a amostra foi centrifugada (800 ×g por 2 min) e o sobrenadante descartado. A etapa de lavagem foi efetuada três vezes.

Para eluição do peptídeo, 5 mL de tampão de eluição (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 6 M cloreto de guanidina e 1 M imidazol, pH 9) foram adicionados à amostra, a qual ficou sob agitação por 5 min à temperatura ambiente. Então, a amostra foi centrifugada (800 ×g por 2 min) e o sobrenadante recuperado. As amostras passaram pelo cartucho Sep-Pak® Vac C18 (Waters) e foram eluídas usando um gradiente de concentrações de acetonitrila acidificada (0,05% ácido trifluoroacético) variando de 10-80%. Todas as frações proteicas foram avaliadas em gel SDS-PAGE 18% após eletroforese. A acetonitrila foi evaporada utilizando o equipamento Speedvac (Thermo Fisher Scientific) e as amostras foram congeladas liofilizadas a -80 °C. Então, o peptídeo recombinante foi suspenso em água ultra pura e a sua concentração foi quantificada utilizando o kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific) com base numa curva padrão de albumina sérica bovina. A quantificação foi realizada em microplacas de 96 poços contendo 25 µL de peptídeo recombinante diluído (1:5 e 1:10) e 200 µL de reagente AB (50:1, v:v). As placas foram incubadas por 30 min a 37 °C e, após incubação, a quantificação foi determinada por espectrofotometria (562 nm).

3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana de r*Litvan* KAM1 foi avaliada contra as bactérias Gram-positivas *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Staphylococcus aureus* SG511 e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* SBS363 e *V. harveyi* ATCC 14126. As bactérias foram cultivadas em meio LB ou LB-NaCl (*Lysogenic Broth*-NaCl: 1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 3% NaCl, pH 7,2) em temperaturas adequadas (**Quadro 2**). A atividade antimicrobiana de r*Litvan* KAM1 foi avaliada pelos testes de concentração mínima inibitória (MIC) como previamente descrito (HETRU; BULET, 1997). Para isso, uma única colônia de cada cepa foi posta para crescer em meio de cultura e temperatura adequados (**Quadro 2**) e o seu crescimento foi acompanhado por espectrofotometria. Ao atingir uma densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0,1 e 0,2, a cultura bacteriana foi diluída 100 vezes em meio de cultura PB (*Poor Broth*: 1% tripton, 1% NaCl, pH 7,2) ou PB-NaCl (*Poor Broth*-NaCl: 1% tripton, 3% NaCl, pH 7,2) e então utilizada para o teste.

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços contendo 90 μL da suspensão microbiana diluída e 10 μL de r*Litvan* KAM1 em diferentes concentrações (10 a 0,5 μM). Os experimentos foram realizados em duplicatas e os microrganismos cresceram sob agitação por 24 h em temperatura ótima de crescimento. Os valores de MIC (em μM) foram definidos pela concentração de peptídeo capaz de inibir 100% do crescimento microbiano, o qual foi mensurado por espectrofotômetro (595 nm). Água ultrapura (solução de suspensão do peptídeo) e ampicilina (10 μM) foram utilizadas como controle negativo e positivo da atividade, respectivamente. Os poços em que foi observada inibição de crescimento foram semeados para avaliar a concentração bactericida mínima (MBC). Para isso, o conteúdo dos poços foi semeado em meio de cultura sólido (LB ou LB-NaCl acrescido de ágar 15 g/L), o qual foi incubado por 48 h à temperatura adequada (**Quadro 2**).

Quadro 2. Bactérias e condições de cultivo.

Microrganismos	Meio de cultivo	Meio para teste	Temperatura
Bactérias Gram-positivas			
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	LB	PB	30 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	LB	PB	37 °C
Bactérias Gram-negativas			
<i>Escherichia coli</i> SBS363	LB	PB	37 °C
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	LB-NaCl	PB-NaCl	20 °C

3.8. Análise das sequências e filogenia

As sequências identificadas em *L. stylirostris* (DE LORGERIL et al., 2005) foram utilizadas para a busca de ortólogos em bancos de dados anotados (*Nucleotide and Protein Collection*) e não anotados (*Expressed Sequence Tags*, *Sequence Read Archive*, *Transcriptome Shotgun Assembly* e *Whole Genome Shotgun Contigs*) utilizando a ferramenta tBLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Todas as sequências recuperadas foram manualmente inspecionadas e traduzidas utilizando o programa ExPasy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>). A presença de peptídeo sinal e pró-domínio foi analisada no programa ProP 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>). As sequências aminoacídicas também foram analisadas quanto à presença de domínios conservados utilizando o programa Conserved Domain Databank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) e as suas propriedades bioquímicas,

como massa molecular e ponto isoelétrico teórico (pI), foram determinadas pelo programa ExPasy ProtParam Tool (<https://web.expasy.org/protparam/>). As sequências aminoacídicas foram alinhadas utilizando o MAFFT versão 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) e as árvores filogenéticas foram geradas no programa MEGA X (KUMAR et al., 2018) utilizando o método *Maximum Likelihood* com 1.000 replicatas (*bootstraps*) e o modelo *Dayhoff*.

A organização gênica das moléculas foi determinada pela comparação entre as sequências de cDNA e as sequências genômicas do banco de dados WGS. Para isso, as sequências foram alinhadas utilizando o MAFFT versão 7. O número de cópias gênicas e a localização dos genes nos *scaffolds* foram determinadas pela análise manual do genoma disponível do camarão *L. vannamei* (ZHANG et al., 2019).

3.9. Distribuição da expressão gênica

A distribuição de expressão gênica foi determinada pela técnica de RT-PCR em diferentes tecidos/órgãos de animais juvenis sadios (hemócitos, brânquias, hepatopâncreas, estômago, intestino médio, intestino posterior, músculo, cordão nervoso e pedúnculo ótico). As reações de RT-PCR foram realizadas num volume de 15 μ L contendo 2 mM $MgCl_2$, 0,4 mM dNTP Mix, 0,2 μ M dos iniciadores (**Quadro 1**), 1 U da enzima Taq DNA polymerase (Sinapse Inc) e 1 μ L de cDNA (diluído 10 vezes). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, hibridização a 58 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 30 s e extensão final a 72 °C por 5 min. A expressão do gene da β -actina (**Quadro 1**) foi utilizada como controle endógeno. Os produtos de amplificação foram avaliados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio.

3.10. Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real

Para determinar o perfil transcricional após as infecções experimentais foram realizadas reações de transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) no sistema StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As reações foram realizadas num volume final de 15 μ L (em duplicatas) na presença de 1 μ L de cDNA (diluído 10 vezes), 0,2 μ M de cada iniciador (**Quadro 1**) e 7,5 μ L Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2 \times (Thermo Fisher Scientific). As reações foram efetuadas nas seguintes condições: desnaturação inicial 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 por análises de curvas de dissociação (60-95 °C; 0,3 °C/s) após as etapas de

amplificação. A eficiência dos iniciadores foi avaliada a partir da amplificação de uma diluição seriada de um *pool* de todas as amostras de cDNA de acordo com a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Para normalizar as análises de expressão gênica, foram efetuadas análises de quatro candidatos a genes de referência (*LvActin*, *LvEF1 α* , *LvRpS6* e *LvRpS3A*) (**Quadro 1**). A melhor condição referência foi determinada utilizando o *software* RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>). Os níveis de expressão de todos os grupos experimentais foram calculados utilizando-se como condição calibradora o grupo *naïve*, conforme a fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os gráficos de expressão relativa e os testes estatísticos foram feitos no programa GraphPad Prism 8. Os dados de RT-qPCR foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. A variação entre os valores foi considerada significativa quando observada uma diferença de expressão relativa superior a 2 vezes (*fold-change*) e $P < 0,05$. A nomenclatura utilizada neste trabalho seguiu as recomendações do MIQE *guidelines* (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Prospecção molecular e análise funcional de novos AMPs em camarões peneídeos

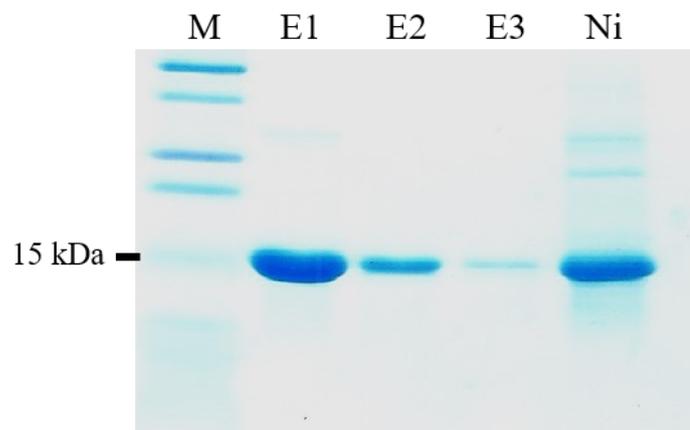
Apesar do esforço de diversos grupos de pesquisa na identificação de novos AMPs em diferentes organismos, a variedade dessas moléculas parece ser muito maior do que se conhece. Neste trabalho, o conhecimento acerca da diversidade de AMPs em camarões peneídeos foi expandido através da caracterização funcional e molecular de uma nova família de AMPs. Com o intuito de reduzir os custos e tempo necessários para realizar a caracterização pelos métodos clássicos, foi utilizado um método de predição por análises *in silico*. De forma geral, esses métodos procuram por moléculas com características inerentes a AMPs em bancos de dados genômicos ou transcritômicos.

A predição pode ser feita a partir de diferentes bancos de dados. É possível utilizar bancos de dados que abrangem uma grande quantidade de sequências, como o banco completo de ESTs ou o banco completo de proteínas preditas a partir de um genoma. Contudo, esses bancos contêm um número muito grande de sequências, o que pode dificultar a busca por novos AMPs. Isso é especialmente problemático quando são utilizadas ferramentas manuais que analisam sequências de forma individual, como o CAMP_{R3} e a ferramenta de predição do PDB. Para contornar esses problemas, utilizar bancos de dados mais restritos que possuem sequências provavelmente associadas com a imunidade dos animais parece uma estratégia mais promissora. Bons exemplos disso são os bancos de dados contendo transcritos de células imunocompetentes ou de indivíduos em estados fisiológicos específicos.

Neste trabalho, a predição de potenciais AMPs foi realizada utilizando um banco transcritômico proveniente de um estudo que identificou um painel de genes associados à capacidade de *L. stylirostris* de sobreviver frente ao patógeno *Vibrio penaeicida* (DE LORGERIL et al., 2005). de Lorgeril e colaboradores (2005) utilizaram da técnica de SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) para comparar o perfil transcricional entre camarões capazes e incapazes de sobreviver a uma infecção por *V. penaeicida*. Nesse painel de genes foram detectadas, principalmente, duas categorias funcionais: genes relacionados ao sistema imune e genes associados a proliferação hematopoiética. Contudo, 9 sequências cujas funções são desconhecidas também foram identificadas pelos autores. As análises pelos softwares utilizados apontaram que uma dessas sequências (GenBank: CV699515) é um potencial AMP por apresentar características bioquímicas inerentes a AMPs clássicos. Essa sequência codifica um peptídeo sinal (19 aa) seguido por um pró-domínio (14 aa) e um peptídeo maduro (105 aa; MM: 11,26 kDa) catiônico (pI: 9,52) sem domínios conservados.

Interessantemente, o estudo de de Lorgeril e colaboradores (2005) foi usado posteriormente para a caracterização de uma família de AMPs (ROLLAND et al., 2010). Dentre as sequências associadas à capacidade dos camarões sobreviverem a infecções, foi identificada uma sequência rica em resíduos de cisteína e prolina (DE LORGERIL et al., 2005). Essa sequência apresentou identidade com proteínas provenientes de camundongos e, inicialmente, foi denominada “*cryptdin-like*”. Foi identificado que a abundância transcricional dessas moléculas era muito superior em animais capazes de sobreviver ao *V. penaeicida* em relação aos animais incapazes (DE LORGERIL et al., 2005). Posteriormente, Rolland e colaboradores (2010) realizaram a caracterização funcional dessas moléculas e constataram que elas compreendiam uma nova família de AMPs de camarões peneídeos, a qual foi denominada de *stylicina*. Isso ressalta o potencial desse banco de dados para a identificação de novos efetores imunológicos e o potencial da sequência apontada como um possível AMP pelos softwares de predição.

Figura 6. Etapas da purificação do peptídeo recombinante.



SDS-PAGE após eluição das amostras imobilizadas em resina Ni-NTA. As eluições 1, 2 e 3 estão representadas por **E1**, **E2** e **E3**, respectivamente. **Ni**: Perfil das proteínas que permaneceram ligadas à resina Ni-NTA após eluição. **M**: marcador molecular.

Para determinar se a sequência identificada neste estudo (GenBank: CV699515) corresponde de fato uma nova família de AMPs, a sua atividade antimicrobiana foi avaliada *in vitro* utilizando peptídeos produzidos em sistema recombinante. Para isso, um homólogo identificado em *L. vannamei* (GenBank: GFRP01009775) foi expresso em *E. coli* BL21 (DE3) e purificado por cromatografia por afinidade metálica, devido à adição da cauda de histidina na extremidade N-terminal do peptídeo maduro. Após lavagem, as amostras foram eluídas três vezes com tampão (**Figura 6**), sendo que a maior parte do peptídeo foi eluído na primeira eluição (**Figura 6**). Apesar da maior parte do peptídeo de interesse ter sido eluído, parte da

amostra também ficou retida na resina Ni-NTA (**Figura 6**). As três eluições foram unidas em uma amostra, a qual passou pelo cartucho Sep-Pak® Vac C18 (Waters). Então, as amostras foram eluídas com acetonitrila, sendo que a maior parte do peptídeo ficou na fração de 40% de acetonitrila), liofilizadas, suspensas em água ultra pura, quantificadas e utilizadas para as análises de atividade antimicrobiana.

Então, a atividade antimicrobiana do peptídeo recombinante foi avaliada contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas por ensaios *in vitro*. Ele foi capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram-positivas *M. luteus* A270 (MIC: 2,5-5 µM) e *S. aureus* SG511 (MIC: 5-10 µM) e da bactéria Gram-negativa *E. coli* SBS363 (MIC: 5-10 µM), mas não de *V. harveyi* ATCC 14126 nas concentrações testadas (**Quadro 3**). Além disso, ele apresentou atividade bactericida contra *M. luteus* A270 (MBC: 2,5-5 µM) e *E. coli* SBS363 (MBC: 5-10 µM) (**Quadro 3**).

Quadro 3. Espectro de atividade antimicrobiana de *Litvan* rKAM1.

Microrganismos	MIC	MBC
Bactérias Gram-positivas		
<i>Micrococcus luteus</i> A270	2,5-5	2,5-5
<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	5-10	NA
Bactérias Gram-negativas		
<i>Escherichia coli</i> SBS363	5-10	5-10
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	NA	NA

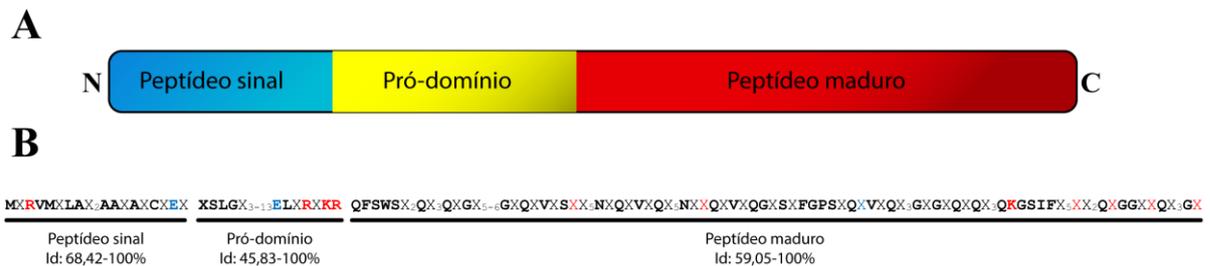
Os valores de **MIC** (concentração inibitória mínima) e **MBC** (concentração bactericida mínima) estão expressos em µM. O intervalo representa a maior concentração de peptídeo em que houve crescimento microbiano e a menor concentração de peptídeo capaz de inibir 100% do crescimento microbiano. NA: não apresentou atividade *in vitro* nas concentrações testadas.

4.2. Kammaricinas, uma nova família de AMPs exclusiva de camarões peneídeos

A sequência de *L. stylirostris* (GenBank: CV699515) foi utilizada para identificação de homólogos em bancos de dados anotados e não anotados. Nessas análises, foram identificadas 66 sequências codificantes completas dessa família em sete espécies de camarões peneídeos (*Farfantepenaeus aztecus*, *F. penicillatus*, *L. stylirostris*, *L. vannamei*, *Litopenaeus setiferus*, *M. japonicus* e *Penaeus monodon*). Além dessas, uma sequência incompleta foi encontrada em *Metapenaeus bennettiae*. Uma sequência de *M. japonicus* também foi encontrada em bancos de dados anotados (GenBank: LC349927). A sequência de *M. japonicus* é

proveniente de um estudo que relacionou essa molécula com respostas de defesa antivirais, uma vez que a expressão da mesma foi induzida após infecções por WSSV (ZHANG et al., 2018). Contudo, os autores não caracterizaram essas moléculas funcionalmente. Nenhuma sequência homóloga à sequência de *L. stylirostris* foi encontrada em outros organismos. As sequências encontradas codificam um precursor composto por um peptídeo sinal (19 aa) seguido por um pró-domínio (14-24 aa) e um peptídeo maduro (~11 kDa) catiônico ($pI = 8,27-10$) sem domínios conservados (**Figura 7A**). Alinhamentos múltiplos mostraram que elas apresentam uma assinatura aminoacídica específica e similaridades variáveis ao longo da molécula (**Figura 7B**). Essas moléculas possuem características clássicas de AMPs, possuindo peptídeo sinal, carga positiva e baixa massa molecular. Além disso, elas apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra diferentes microrganismos mesmo em baixas concentrações. Apesar de o mecanismo de ação dessas moléculas ser desconhecido, é possível afirmar que elas compreendem uma nova família de AMPs, a qual é exclusiva de camarões peneídeos. Por ser exclusiva de camarões peneídeos, elas foram batizadas de kammaricinas (KAM), uma referência à palavra “kámmaros”, do grego antigo que significa “camarão”.

Figura 7. Estrutura primária e sequência consenso da família das kammaricinas.



(A) Representação da estrutura primária das kammaricinas. N e C representam as extremidades N-terminal e C-terminal, respectivamente. (B) Sequência aminoacídica consenso das kammaricinas. Os resíduos aminoacídicos conservados em todas as sequências estão destacados em negrito e “X” representa qualquer aminoácido. Os resíduos carregados positivamente ou negativamente estão destacados em vermelho e azul, respectivamente. As linhas indicam as sequências do peptídeo sinal, pró-domínio e peptídeo maduro. **Id**: Identidade da região destacada entre todas as sequências.

Aparentemente, as kammaricinas parecem ser exclusivas de camarões peneídeos, mas o seu surgimento não foi um evento recente. Os gêneros de camarões peneídeos podem ser divididos em dois grandes grupos que se separaram há mais de 200 milhões de anos atrás (KUMAR et al., 2017). Enquanto que o primeiro grupo é denominado *Penaeini*, o segundo grupo é dividido em dois grupos: *Parapenaeini* e *Trachypenaeini*. Sequências de kammaricinas foram encontradas em diferentes espécies de *Penaeini*, mas uma sequência parcial também foi encontrada em *Metapenaeus*, o qual pertence ao táxon *Trachypenaeini*. Por estarem em ambos

os clados, é possível sugerir que essa família surgiu antes da diversificação dos camarões peneídeos, estando presentes em diversas espécies.

Diferentemente dos demais AMPs de camarões peneídeos, as kammaricinas não apresentam cisteínas em seus peptídeos maduros. Esses aminoácidos são capazes de formar pontes dissulfeto que trazem rigidez e estabilidade para as proteínas em solução, aumentando a resistência contra degradação química ou proteolítica (SRIVASTAVA et al., 2020; TAM et al., 2015). Isso é especialmente importante em proteínas que são secretadas, uma vez que elas são submetidas a condições adversas no meio extracelular (NETTO et al., 2007). Ao encontro com essa ideia, os AMPs de camarões peneídeos parecem ser secretados para combater os patógenos presentes na hemolinfa ou no lúmen intestinal (DESTOUMIEUX et al., 2000; FARIAS et al., 2019).

Outra característica que difere as kammaricinas dos demais AMPs de camarões peneídeos é a presença de pró-domínio entre o peptídeo sinal e o peptídeo maduro. Apesar de o pró-domínio das sequências diferenciarem em tamanho e composição aminoacídica, todos eles terminam com uma arginina seguida por um resíduo aminoacídico variável, uma lisina e uma arginina, indicando um possível sítio de clivagem por enzimas do tipo furina. A presença de pró-domínios em moléculas do sistema imune pode ser associada com o local e momento de atuação dessas moléculas. Um exemplo disso é a ativação do sistema da pró-fenoloxidase (proPO), uma das principais respostas imunoefetoras de crustáceos (AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013). Esse sistema consiste em uma série de reações químicas em cascata, sendo que parte dessas reações geram moléculas tóxicas para os patógenos. Contudo, essas moléculas também são tóxicas para os animais e, conseqüentemente, essa cascata é muito bem regulada. Muitas enzimas desse sistema são geradas em sua forma inativa, sendo ativadas através da remoção dos seus pró-domínios após o reconhecimento de microrganismos patogênicos (AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013). Dessa forma, as moléculas tóxicas são geradas de forma controlada no local de infecção.

Outra característica interessante das kammaricinas é a presença de um resíduo conservado de glutamina na primeira posição do peptídeo maduro. O peptídeo maduro das peneidinas do subgrupo 3 também apresentam uma glutamina na extremidade N-terminal, a qual sofre uma ciclização em ácido piroglutâmico (pGlu) (DESTOUMIEUX et al., 1997). Contudo, ensaios *in vitro* demonstraram que essa modificação não altera a atividade antimicrobiana (DESTOUMIEUX et al., 1999). Com isso, Destoumieux e colaboradores (1999) concluíram que essa modificação pós-traducional parece estar mais associada com o aumento de estabilidade do peptídeo do que com as propriedades biológicas da molécula

(DESTOUMIEUX et al., 1999). Portanto, é possível sugerir que as kammaricinas também podem sofrer a ciclização do resíduo de glutamina N-terminal em ácido piroglutâmico (pGlu) mas que essa modificação não deve alterar a atividade antimicrobiana *in vitro* dessas moléculas.

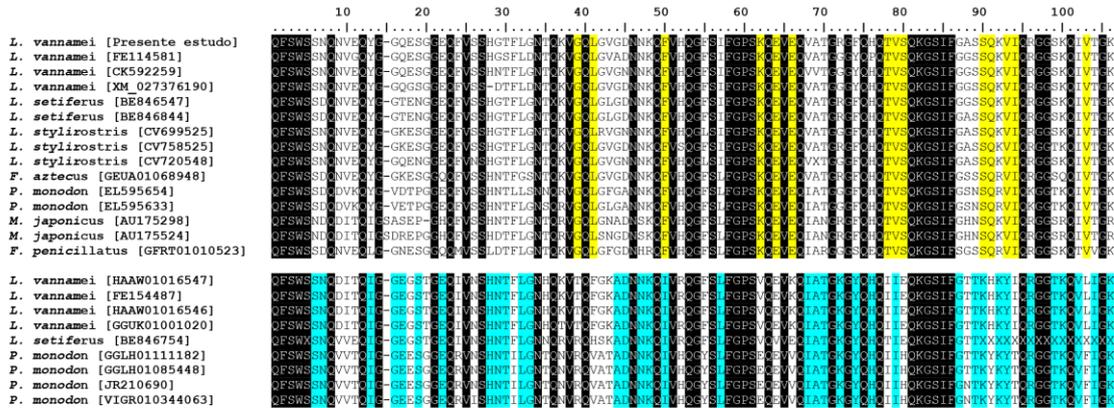
4.3. As kammaricinas formam uma família gênica diversa composta por dois membros

Para compreender melhor a diversidade das kammaricinas, as sequências completas obtidas em bancos de dados anotados e não anotados foram traduzidas e os seus peptídeos maduros foram alinhados. Essas sequências foram separadas em dois membros distintos (KAM1 e KAM2) de acordo com a posição conservada de aminoácidos específicos (**Figura 8A**). Os peptídeos maduros de KAM1 apresentam 104 ou 106 resíduos aminoacídicos (MM: 11,06 – 11,69 kDa) e carga positiva (pI: 8,26 – 9,98). Os peptídeos maduros de KAM2 apresentam 105 resíduos aminoacídicos (MM: 11,50 – 11,59 kDa) e são catiônicos (pI: 9,50 – 10). As sequências de KAM1 foram encontradas em *L. vannamei*, *L. setiferus*, *L. stylirostris*, *F. aztecus*, *P. monodon*, *M. japonicus* e *F. penicillatus* e as sequências de KAM2 foram encontradas apenas em *L. vannamei*, *L. setiferus* e *P. monodon* (**Figura 8B**). Essas diferenças bioquímicas podem resultar em diversas diferenças biológicas, como o espectro de atividade e a distribuição de expressão gênica. Em *L. vannamei*, o ALF do Grupo G apresenta um espectro de atividade maior que o ALF do Grupo E, de acordo com a atividade dos β -hairpins dessas moléculas (MATOS et al., 2018). Além disso, enquanto que o Grupo G é expresso em maior abundância nos estágios finais de desenvolvimento, a expressão do Grupo E reduz ao longo do desenvolvimento de *L. vannamei*. Com isso, Matos e colaboradores (2018) sugeriram que os ALFs do Grupo E podem estar envolvidos com a proteção durante os estágios larvais, uma vez que os ALFs do Grupo G não são expressos durante esses estágios, e que os ALFs do Grupo G estão envolvidos com a proteção de *L. vannamei* juvenis e adultos (MATOS et al., 2018).

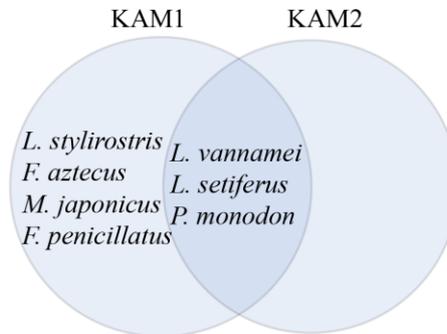
Afim de entender as relações filogenéticas dessas moléculas, o peptídeo maduro das sequências completas foi utilizado para reconstrução de uma árvore filogenética utilizando o método *Maximum Likelihood*. Apenas uma sequência de KAM1 e KAM2 foi utilizada por espécie. As isoformas de KAM1 e KAM2 se agruparam em dois cladogramas distintos (**Figura 9A**). No clado de KAM1, as kammaricinas dos camarões peneídeos ocidentais (*Litopenaeus* e *Farfantepenaeus*) se agruparam com a kammaricina de *F. penicillatus*. Esses grupos se agruparam com o clado contendo a KAM1 de *P. monodon* e, por fim, a KAM1 de *M. japonicus* ficou como grupo externo desses membros. No clado de KAM2, as sequências de *L. vannamei* e *L. setiferus* se agruparam com a KAM2 de *P. monodon* (**Figura 9A**).

Figura 8. Assinatura aminoacídica e distribuição de KAM1 e KAM2 em camarões penéideos.

A



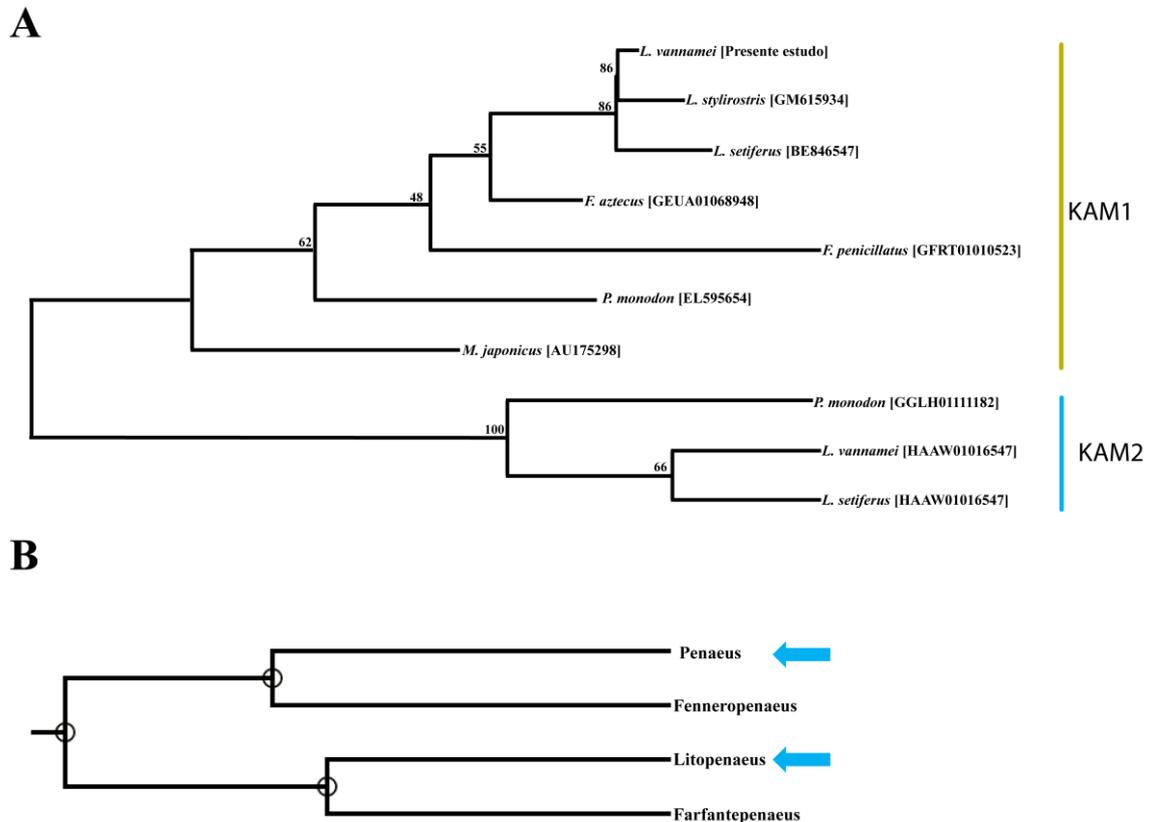
B



(A) Os resíduos aminoacídicos conservados em todas as seqüências estão marcados em preto. Resíduos específicos de KAM1 estão destacados na cor amarela e os de KAM2 estão destacados na cor azul. (B) O diagrama de Venn ilustra a distribuição de KAM1 e KAM2 nas espécies de camarões penéideos.

Seqüências que codificam KAM2 foram encontradas em apenas três espécies, sendo elas dos gêneros *Litopenaeus* e *Penaeus*. Contudo, os camarões dos gêneros *Litopenaeus* e *Penaeus* são evolutivamente mais próximos dos camarões dos gêneros *Farfantepenaeus* e *Fenneropenaeus*, respectivamente (Figura 9B) (KUMAR et al., 2017). Isso pode sugerir alguns eventos evolutivos nesse grupo, sendo que KAM2 pode ter (1) surgido independentemente nos gêneros *Litopenaeus* e *Penaeus*, (2) sofrido perda gênica nos gêneros *Farfantepenaeus* e *Fenneropenaeus* ou (3) estar presente nesses gêneros, mas não ter sido encontrada. Apesar da grande abundância de seqüências completas de KAM1 (50 seqüências), poucas seqüências completas de KAM2 foram encontradas neste estudo (16 seqüências). Portanto, é plausível supor que KAM2 pode estar presente em outros gêneros de camarões penéideos, mas não ter sido adicionada aos bancos de dados até o momento.

Figura 9. Árvore filogenética resultante dos alinhamentos dos peptídeos maduros de KAM1 e KAM2 e árvore filogenética dos camarões peneídeos que apresentam KAM2.



(A) A árvore filogenética das kammaricinas foi reconstruída através do método *Maximum Likelihood* com 1.000 replicatas (bootstraps) e o modelo *Dayhoff*. As linhas amarelas e azuis indicam as sequências de KAM1 e KAM2, respectivamente. (B) A árvore filogenética dos gêneros *Penaeus*, *Fenneropenaeus*, *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus* foi extraída e modificada do projeto *Tree of Life* (KUMAR et al., 2017). As setas azuis indicam os gêneros que possuem sequências de KAM2.

4.4. As kammaricinas são geradas a partir de diferentes genes e *splicing* alternativo

Com o intuito de descobrir se KAM1 e KAM2 são codificadas por diferentes genes, a organização genômica das kammaricinas de *L. vannamei* foi investigada através da análise manual do genoma disponível (GenBank: ASM378908) (ZHANG et al., 2019). Essas análises mostraram que as kammaricinas são codificadas por sequências gênicas distintas. Enquanto que *KAM1* possui quatro cópias gênicas, *KAM2* possui apenas uma cópia gênica (**Figura 10A**). Duas cópias gênicas de *KAM1* e o gene *KAM2* foram encontradas no *scaffold* LVANscaffold_750 (NW_020872692), sendo que todas estavam no *frame* negativo (**Figura 10A**). As outras duas cópias gênicas de *KAM1* foram encontradas no *scaffold* LVANscaffold_1255 (NW_020868571), sendo que uma está no *frame* negativo e outra no *frame* positivo (**Figura 10A**). Apesar de *KAM1* apresentar múltiplas cópias em *L. vannamei*, essas cópias codificam peptídeos com poucas variações aminoacídicas (**Figura 10B**) Portanto,

as kammaricinas compõem uma família multigênica, sendo que cada membro é codificado por diferentes genes.

Figura 10. Genes de kammaricinas nos *scaffolds* do genoma de *Litopenaeus vannamei* e alinhamento das sequências aminoacídicas correspondentes.

A

LVANscaffold_750 (NW_020872692)



LVANscaffold_1255 (NW_020868571)



B

KAM1-1	MTRVMFLAVVAFAICAEA	ASLG-----	SEGELHRAKR	QFSWSSNQNV	EQYGGQ	NSGGEQFVSS	HGTFLG	N	NTQKVGQL
KAM1-2	MTRVMFLAVVAFAICAEA	ASLG-----	SEGELHRAKR	QFSWSSNQNV	EQYGGQ	ESGGEQFVSS	HGTFLG	N	NTQKVGQL
KAM1-3	MTRVMFLAVVAFAICAEA	ASLG-----	SEGELHRAKR	QFSWSSNQNV	EQYGGQ	ESGGEQFVSS	HGTFLG	N	NTQKVGQL
KAM1-4	MTRVMFLAVVAFAICAEA	ASLG-----	SEGELHRAKR	QFSWSSNQNV	EQYGGQ	ESGGEQFVSS	D-TFLD	N	NTQKVGQL
KAM2-1	MTRVMFLAVVAFAICAEA	ASLGNQLQLQ	AEGGSEELHRAKR	QFSWSSNQD	ITQIGGEGST	GGEQIVNSHNT	FLGNHQT	V	TVTQF
	Peptídeo sinal		Pró-dominio		Peptídeo maduro				
KAM1-1	GVGDNNKQFVHQGFSIFGPSKQEVEQVATGGGYQHQTVSQKGSIFGGSSQKVIQRGGSKQIVTGK								
KAM1-2	GVGDNNKQFVHQGFSIFGPSKQEVEQVATGRGYQHQTVSQKGSIFGGSSQKVIQRGGSKQIVTGK								
KAM1-3	GVGDNNKQFVHQGFSIFGPSKQEVEQVATGRGFQHQTVSQQKGSIFDASSQKVIQRGGSKQIVTGK								
KAM1-4	GVGDNNKQFVHQGFSIFGPSKQEVEQVATGGGYQHQTVSQKGSIFGGSSQKVIQRGGSKQIVTGK								
KAM2-1	GKADNNKQIVRQGFSLFGPSVQEVKQIATGKGYQHQIIEQKGSIFGTTKHKYIQRGGTKQVLIIGK								
	Peptídeo maduro								

(A) Representação esquemática de parte dos *scaffolds* 750 e 1255 do genoma de *L. vannamei* (GenBank: ASM378908). As setas azuis e vermelhas representam os genes *KAM1* e *KAM2* de *L. vannamei*, respectivamente. As setas apontando para esquerda ou direita representam o frame de transcrição negativo ou positivo, respectivamente. (B) Alinhamento das sequências aminoacídicas das quatro cópias de *KAM1* e de *KAM2* de *L. vannamei* destacando as variações aminoacídicas de *KAM1* em vermelho.

A presença de múltiplas cópias de um mesmo gene pode estar associada com a expressão desse gene. Na ostra *Crassostrea gigas*, os AMPs sofrem de muitos polimorfismos genéticos, como as variações no número de cópias gênicas (*Copy Number Variation*; CNV). CNV é um tipo de polimorfismo caracterizado pela diferença no número de cópias de um gene específico entre o genoma de indivíduos de uma mesma espécie (BACHÈRE et al., 2015). Um fenótipo resultante dessas variações é a alteração de expressão gênica. De fato, Schmitt e colaboradores (2013) conseguiram associar o número de cópias gênicas de duas famílias de AMPs, *Cg-Prp* e *Cg-Defs*, com a expressão desses genes. Portanto, é plausível assumir que a presença das quatro cópias gênicas de *KAM1* pode estar influenciando positivamente na expressão basal dessa molécula. Por sua vez, esse aumento de expressão gênica pode estar associado com a capacidade dos camarões enfrentarem microrganismos. De fato, os níveis de

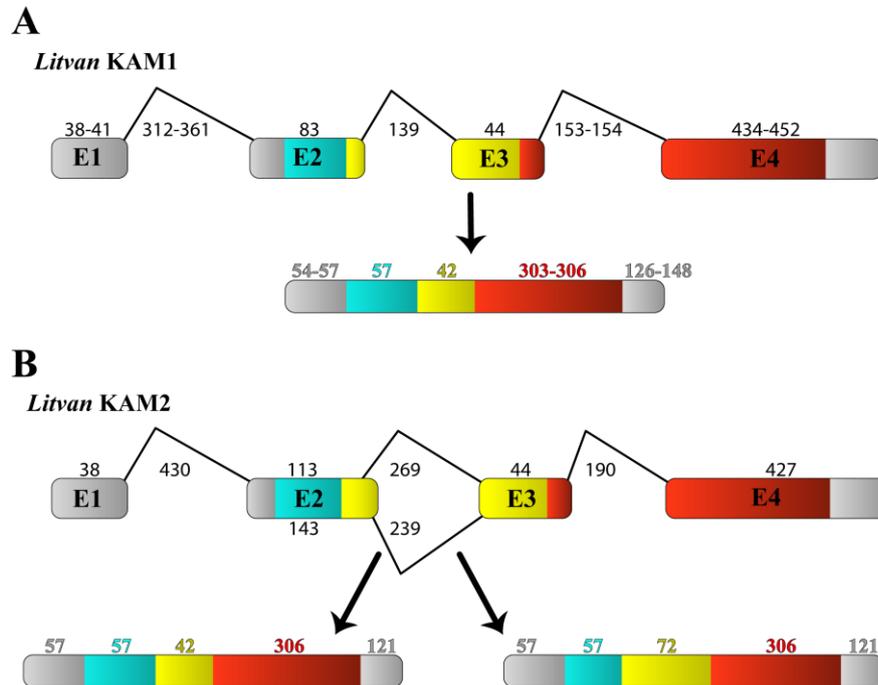
expressão de alguns AMPs do camarão *L. stylirostris* estão associados com a capacidade desses animais de sobreviverem a infecções por *V. penaeicida* (DE LORGERIL et al., 2008).

Apesar de as kammaricinas de *L. vannamei* serem codificadas por diferentes genes, elas apresentam uma organização gênica similar. Os genes *KAM1* e *KAM2* são compostos por quatro éxons separados por três íntrons (**Figura 11**). O primeiro éxon codifica a maior parte da região não traduzida 5' (*Untranslated Region 5'* ou 5' UTR) e o segundo éxon codifica o final da região 5' UTR, todo o peptídeo sinal e parte do pró-domínio. O terceiro éxon codifica o final do pró-domínio e o início do peptídeo maduro. Por fim, o quarto éxon codifica o restante do peptídeo maduro e a região não traduzida 3' (*Untranslated Region 3'* ou 3' UTR).

Interessantemente, o gene *KAM2* possui um segundo sítio de *splicing* no final do segundo éxon, gerando precursores com pró-domínios de tamanhos distintos (**Figura 11B**). Nesse caso, os últimos 30 nucleotídeos do segundo éxon seriam removidos com o segundo íntron. Conseqüentemente, o pró-domínio dessas moléculas poderia ter 14 ou 24 resíduos aminoacídicos. Além disso, o pró-domínio resultante do *splicing* alternativo de *KAM2* teria uma sequência muito similar ao pró-domínio de *KAM1* (**Figura 12**). A maior parte dos transcritos de *KAM2* possuem um pró-domínio de 24 resíduos aminoacídicos, mas uma sequência (GenBank: HAAW01016547) contendo o pró-domínio de 14 resíduos aminoacídicos foi encontrada em bancos de dados transcritômicos, corroborando com a hipótese de *splicing* alternativo (**Figura 12**). Por outro lado, os genes de *KAM1* não aparentam ter um segundo sítio de *splicing* nessa região e nenhum transcrito que corroborasse com esse fenômeno em *KAM1* foi encontrado.

Diferentemente de *L. vannamei*, tanto *KAM1* quanto *KAM2* de *P. monodon* parecem sofrer *splicing* alternativo. De maneira geral, as sequências de *KAM1* e *KAM2* possuem pró-domínios com 14 e 17 resíduos aminoacídicos, respectivamente (**Figura 12**). Contudo, um transcrito de *KAM1* (GenBank: GGLH01100406) contendo um pró-domínio de 17 resíduos aminoacídicos e um transcrito de *KAM2* (GenBank: GGLH01111182) contendo um pró-domínio de 14 resíduos aminoacídicos foram encontrados (**Figura 12**). Portanto, é possível sugerir que essas moléculas também sofram *splicing* alternativo, mas uma confirmação através da análise do genoma de *P. monodon* precisa ser realizada.

Figura 11. Organização gênica dos genes *KAM* do camarão *Litopenaeus vannamei*.

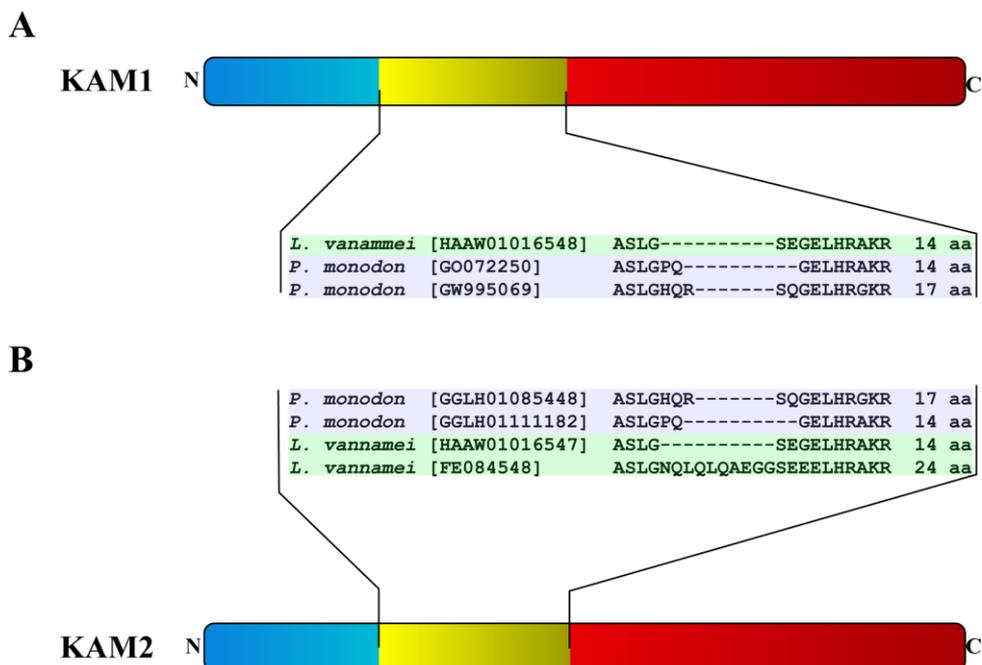


Organização gênica de *Litvan KAM1* (A) e *Litvan KAM2* (B). Os retângulos coloridos e as linhas pretas representam, respectivamente, os éxons (E1: éxon 1; E2: éxon 2; E3: éxon 3; E4: éxon 4) e íntrons dos genes *KAM* de *L. vannamei*. As regiões cinzas, azuis, amarelas e vermelhas representam as regiões não traduzidas (5' e 3'), o peptídeo sinal, o pró-domínio e o peptídeo maduro das kammaricinas, respectivamente. O tamanho das sequências está representado em pares de base.

O *splicing* alternativo durante o processamento de mRNAs contribui significativamente para a diversidade proteômica e para o controle de expressão gênica (WANG; BURGE, 2008). O *splicing* é um mecanismo que é finamente regulado dependendo de diferentes fatores, como os estágios de desenvolvimento e os tecidos do organismo. Esse fenômeno pode definir se uma determinada proteína será solúvel ou transmembrana, ou gerar isoformas que serão importantes para definir o sexo de um organismo (WANG; BURGE, 2008). O *splicing* alternativo do pró-domínio foi registrado tanto em proteínas transmembrana quanto em proteínas secretadas de mamíferos (DUHACHEK-MUGGY et al., 2013; LONKA-NEVALAITA et al., 2010). Os pró-domínios de tamanhos diferentes determinaram se proteínas transmembranas eram ou não enviadas para a superfície celular. Além disso, o *splicing* alternativo de proteínas secretadas determinou a localização intracelular e a velocidade de liberação no meio extracelular das diferentes isoformas. Além disso, alguns estímulos específicos induziam a via secretora de apenas uma dessas isoformas (LONKA-NEVALAITA et al., 2010). Portanto, é possível que os diferentes pró-domínios das kammaricinas possam induzir respostas imunes mais rápidas ou mais lentas através de estímulos diferentes. Além

disso, é possível que essas moléculas com diferentes pró-domínios sejam geradas em tipos celulares diferentes ou frente a estímulos específicos.

Figura 12. Sequências dos diferentes pró-domínios de KAM1 e KAM2 de *Litopenaeus vannamei* e *Penaeus monodon*.



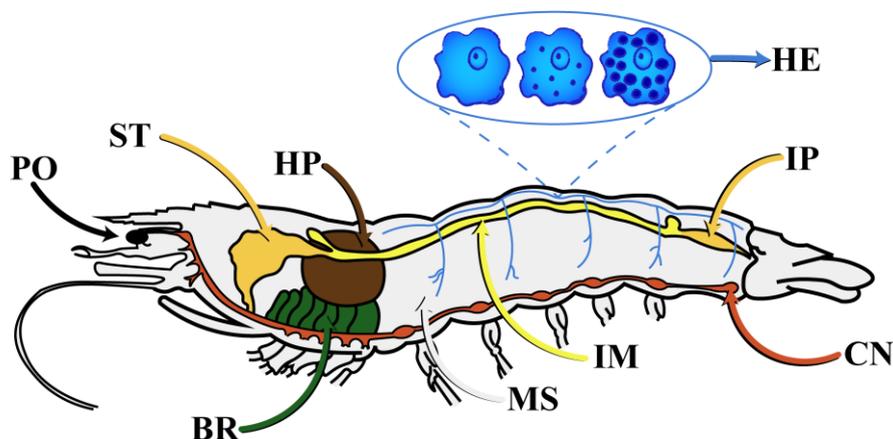
Representação esquemática da estrutura primária de KAM1 (A) e KAM2 (B). As extremidades N-terminal e C-terminal estão representadas por N e C. Os retângulos azuis, amarelos e vermelhos representam o peptídeo sinal, pró-domínio e peptídeo maduro das kammaricinas. As sequências dos diferentes pró-domínios estão representadas no centro da figura, sendo que os retângulos verdes e roxos estão sobre as sequências de *L. vannamei* e *P. monodon*, respectivamente.

4.5. Distribuição da expressão gênica de *Litvan* KAM1 e *Litvan* KAM2

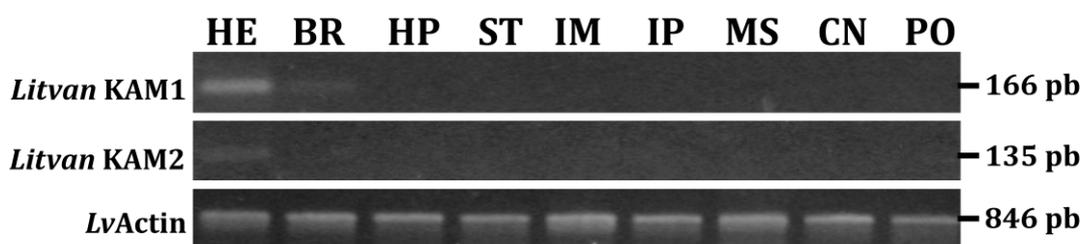
Afim de compreender quais tecidos são responsáveis pela produção de kammaricinas, os níveis transcricionais de *Litvan* KAM1 e *Litvan* KAM2 foram avaliados em diferentes tecidos de animais sadios (hemócitos circulantes, brânquias, hepatopâncreas, estômago, intestino médio, intestino posterior, músculo, cordão nervoso e pedúnculo ótico) por RT-PCR. A integridade das amostras foi avaliada pela expressão da β -actina, a qual se mostrou estável em todos os tecidos (Figura 13). Transcritos de ambos os genes foram encontrados majoritariamente em hemócitos e, em menor grau, nas brânquias (Figura 13).

Figura 13. Distribuição de expressão gênica de *Litvan KAM1* e *Litvan KAM2*.

A



B



Os seguintes órgãos/tecidos estão destacados: hemócitos (HE), brânquias (BR), hepatopâncreas (HP), estômago (ST), intestino médio (IM), intestino posterior (IP), músculo (MS), cordão nervoso (CN) e pedúnculo ótico (PO). A: Esquema ilustrativo de um camarão peneídeo com os órgãos analisados destacados. B: Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado em brometo de etídio mostrando a amplificação de *Litvan KAM1*, *Litvan KAM2* e de *LvActin* (controle endógeno). O tamanho dos produtos de amplificação está representado em pares de base (pb).

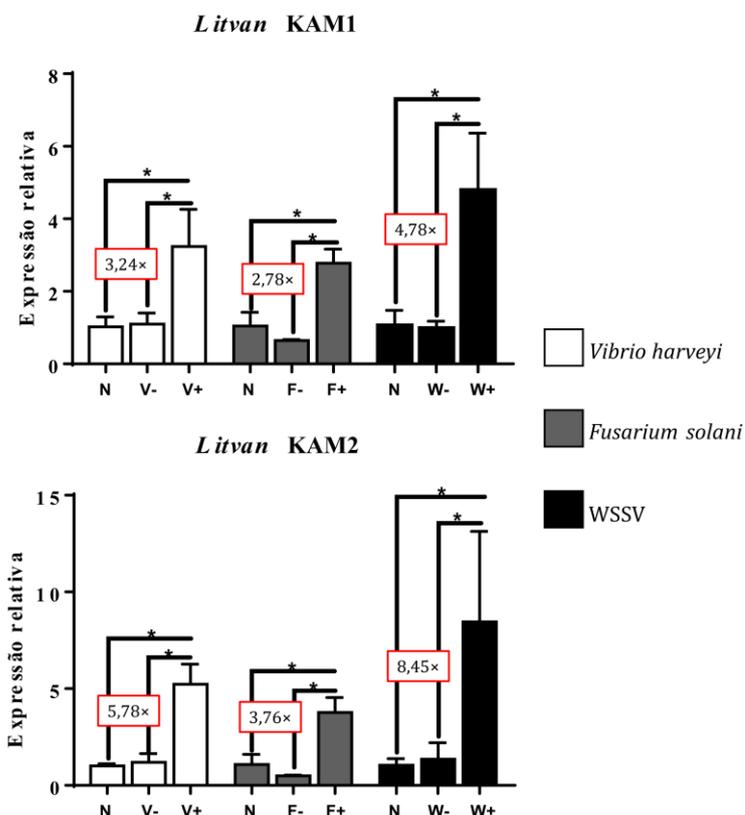
A presença de transcritos de kammaricinas nos hemócitos circulantes de animais sadios indica que essas moléculas são constitutivamente sintetizadas por essas células. Na verdade, essas moléculas foram previamente identificadas em hemócitos de *M. japonicus* sadios. Além disso, a localização dessas moléculas entre as populações hemocitárias foi avaliada por imunofluorescência e as kammaricinas de *M. japonicus* foram encontradas nos grânulos de hemócitos granulares (ZHANG et al., 2018). Essa é uma característica muito comum dos AMPs de camarões peneídeos. Apesar de as peneidinas serem muito relevantes para as respostas de defesa, representando grande parte dos transcritos de hemócitos (GROSS et al., 2001), normalmente essas moléculas não são induzidas frente a infecções. Na verdade, essas moléculas são constitutivamente expressas nos hemócitos circulantes e armazenadas nos grânulos hemocitários. Frente a uma infecção, as peneidinas armazenadas são liberadas na hemolinfa para combater os patógenos (DESTOUMIEUX et al., 2000). Assim como as peneidinas, as crustinas também são expressas constitutivamente nos hemócitos e armazenadas nos grânulos dessas células (ANTONY; BRIGHT SINGH; PHILIP, 2010).

Neste estudo, a expressão gênica de *Litvan* KAM1 e *Litvan* KAM2 também foi detectada nas brânquias. Uma vez que os camarões peneídeos apresentam um sistema circulatória aberto/semiaberto, a presença de transcritos de imunofatores em outros tecidos além dos hemócitos pode estar associada à infiltração hemocitária (SILVEIRA et al., 2018). Nesse sentido, é provável que os transcritos de kammaricinas detectados nas brânquias sejam produzidos pelos hemócitos infiltrados nesse órgão. Ao encontro com essa ideia, peneidinas e crustinas exclusivamente hemocitárias foram detectadas em outros tecidos além da hemolinfa (SILVEIRA et al., 2018). Na verdade, a única família de AMPs de camarões peneídeos que é sabidamente expressa em outros tecidos além dos hemócitos é a família das stylicinas (FARIAS et al., 2019). Contudo, para determinar os verdadeiros sítios de expressão gênica de kammaricinas são necessárias técnicas complementares, como hibridização *in situ* ou imunofluorescência.

4.6. A expressão gênica das kammaricinas é altamente induzida nos hemócitos frente a infecções

Finalmente, os níveis transcricionais de *Litvan* KAM1 e *Litvan* KAM2 foram avaliados nos hemócitos circulantes de animais experimentalmente infectados com três patógenos de camarões não relacionados: a bactéria Gram-negativa *V. harveyi* ATCC14126, o fungo filamentoso *F. solani* e o WSSV (**Figura 14**). Após 48 h de infecção, a expressão de *Litvan* KAM1 e *Litvan* KAM2 aumentou, respectivamente, 3,24 e 5,78 vezes frente ao desafio com *V. harveyi* ATCC14126 (**Figura 14**). Quanto à infecção fúngica, a expressão de *Litvan* KAM1 e *Litvan* KAM2 aumentou, respectivamente, 2,78 e 3,76 vezes (**Figura 14**). Quanto à infecção viral, a expressão de *Litvan* KAM1 e *Litvan* KAM2 aumentou 4,78 e 8,45 vezes, respectivamente (**Figura 14**).

Figura 14. Perfil transcricional de kammaricinas nos hemócitos circulantes de *Litopenaeus vannamei* após 48 horas de uma infecção por *Vibrio harveyi*, *Fusarium solani* ou WSSV.



Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. As barras brancas representam os valores médios de expressão relativa dos animais infectados com *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (V+) e injetados com água do mar estéril (V-). As barras cinzas representam os valores médios de expressão relativa dos animais infectados com *Fusarium solani* (F+) e injetados com solução salina estéril (F-). As barras pretas representam os valores médios de expressão relativa dos animais infectados com WSSV (W+) e injetados com o inóculo livre de WSSV (W-). N: animais não manipulados (grupo *naïve*). Asteriscos (*): diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$). Os valores de fold-change entre os grupos *naïve* e os grupos infectados estão representados dentro dos retângulos vermelhos.

Interessantemente, os resultados do presente estudo mostraram que as kammaricinas são induzidas frente a três patógenos de classes muito distintas, mas não frente às injúrias causadas pela inserção de agulhas nos animais. Isso pode significar que a expressão dessas moléculas é regulada após o reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) muito variados. O primeiro evento para desencadear qualquer reação imune é o reconhecimento do patógeno no corpo hospedeiro. Esse reconhecimento é feito devido aos MAMPs presentes nos microrganismos. Os MAMPs são caracterizados por serem moléculas específicas e essenciais dos microrganismos, sendo muito conservados em cada classe de microrganismo (MOGENSEN et al., 2010). Entre os MAMPs clássicos estão o LPS de bactérias Gram-negativas, o β -1,3-glucano de fungos e o dsDNA rico em AT de alguns vírus (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014; MOGENSEN et al., 2010). O reconhecimento dessas moléculas desencadeia uma série de respostas imunes, incluindo a

regulação da expressão gênica de efetores imunológicos. Por exemplo, a expressão de crustinas do Tipo IV em hemócitos foi induzida após desafio com LPS e β -1,3-glucano (LI et al., 2013). Contudo, esse também pode ser o resultado das interações entre patógeno e hospedeiro. Portanto, para avaliar as razões pelas quais essas moléculas são reguladas, é necessário fazer experimentos complementares, como avaliar a expressão gênica após desafio com microrganismos mortos ou seus respectivos MAMPs.

As kammaricinas compõem os primeiros AMPs de camarões peneídeos que são altamente induzidos nos hemócitos frente a infecções por patógenos de classes tão distintas. Normalmente, a indução da expressão gênica dos AMPs de camarões peneídeos ocorre de maneira mais restrita, sendo específica contra determinadas classes ou espécies de microrganismos (GONCALVES et al., 2014). Além disso, a indução dos genes de kammaricinas de *L. vannamei* frente aos três patógenos pode indicar que elas possuem um papel importante durante infecções. É possível que esse aumento de expressão esteja ocorrendo para intensificar as respostas humorais contra os patógenos. Ao encontro com essa ideia, genes de AMPs são mais induzidos em linhagens de camarões resistentes a infecções por *Vibrio* em comparação com linhagens não selecionadas (DE LORGERIL et al., 2008). A relação entre a indução gênica de AMPs e a sobrevivência de camarões também foi demonstrada. A expressão gênica de ALFs de *P. monodon* foi induzida após infecções com WSSV e *V. harveyi* (PONPRATEEP et al., 2012). Contudo, o silenciamento pós-transcricional dessas moléculas levou ao aumento das taxas de mortalidade dos camarões infectados por esses patógenos (PONPRATEEP et al., 2012). Portanto, as kammaricinas podem apresentar um envolvimento importante durante as respostas de defesa contra patógenos e, conseqüentemente, seria interessante avaliar o real envolvimento dessas moléculas *in vivo* por técnicas complementares, como o silenciamento pós-transcricional por RNAi.

Por outro lado, a expressão gênica das kammaricinas identificadas em *M. japonicus* foi avaliada frente aos vírus WSSV e YHV (*Yellow Head Virus*) e à bactéria Gram-negativa *Vibrio parahaemolyticus* (ZHANG et al., 2018). Enquanto que a expressão gênica de kammaricinas nos hemócitos aumentou após 48 h de infecção por WSSV, os níveis transcricionais dessas moléculas se mantiveram estáveis durante as infecções por YHV e *V. parahaemolyticus*. Além disso, o número de hemócitos granulares contendo kammaricinas internalizadas em seus grânulos citoplasmáticos aumentou gradualmente após a infecção por WSSV. Por essas razões, Zhang e colaboradores (2018) sugeriram que essas moléculas estavam associadas apenas às respostas de defesas antivirais. É possível que essa divergência de regulação gênica entre o presente estudo e o estudo de Zhang e colaboradores (2018) esteja

associada aos microrganismos utilizados ou às concentrações utilizadas para as infecções experimentais.

Apesar de ser altamente induzida frente a patógenos, a expressão das kammaricinas de *L. vannamei* não se alterou nos grupos de injúria. Neste trabalho, animais injetados com água do mar filtrada, solução salina e um macerado de camarões sadios foram utilizados como controle da infecção bacteriana, fúngica e viral, respectivamente. Os AMPs são moléculas multifuncionais, podendo apresentar outras atividades biológicas, como o envolvimento em regeneração tecidual ou processos inflamatórios (GUANÍ-GUERRA et al., 2010). As crustinas parecem estar envolvidas com processos de regeneração tecidual e ecdise, e a sua expressão pode ser induzida após injúrias por corte tecidual (LI et al., 2012). Além disso, a expressão das stylicinas de *L. vannamei* aumentou em animais injetados com macerado de camarões sadios, indicando que essa família de AMPs é induzida após o reconhecimento de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e que elas pode estar associadas a processos inflamatórios e regeneração tecidual (FARIAS et al., 2019).

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

5.1. Conclusão

Em conclusão, as kammaricinas compreendem uma diversa família de AMPs exclusiva de camarões peneídeos, a qual é altamente induzida nos hemócitos frente a infecções.

5.2. Perspectivas

- Ampliar o conhecimento acerca do espectro de atividade antimicrobiana de *Litvan* KAM1 e *Litvan* KAM2 através de ensaios de atividade *in vitro* com outros microrganismos de interesse aquícola e clínico;
- Avaliar a atividade sinérgica *in vitro* de *Litvan* KAM1 e *Litvan* KAM2;
- Determinar o envolvimento das kammaricinas de *L. vannamei* nas respostas de defesa *in vivo* pelo silenciamento pós-transcricional por RNAi;
- Investigar o mecanismo de ação dessa nova família de AMPs lineares.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. C. et al. Predicting antimicrobial peptides from eukaryotic genomes: In silico strategies to develop antibiotics. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 301–308, 2012.
- AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 990–1001, 2013.
- 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. 186–198, 2016.
- ANTONY, S. P.; BRIGHT SINGH, I. S.; PHILIP, R. Molecular characterization of a crustin-like, putative antimicrobial peptide, Fi-crustin, from the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 1, p. 216–220, 2010.
- ASCHE, F. et al. The economics of shrimp disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 107397, 2020.
- AVILA, E. E. Functions of Antimicrobial Peptides in Vertebrates. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, n. 11, p. 1098–1119, 2017.
- 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. et al. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 50–64, 2015.
- BANDEIRA, P. T. et al. A Type IIa crustin from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (crusFpau) is constitutively synthesized and stored by specific granule-containing hemocyte subpopulations. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 97, n. December 2019, p. 294–299, 2020.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.). **Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. 2. ed. Panamá: OIRSA, 2014. p. 237–304, 2014.
- 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. 16, 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, n. 3, p. 278–293, 2002.
- BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 3, p. 254–260, 2017.

BOONCHUEN, P. et al. Hemocyanin of *Litopenaeus vannamei* agglutinates *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (VP AHPND) and neutralizes its toxin. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 84, p. 371–381, 2018.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 169–184, 2004.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

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.

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, n. 2, p. 174–183, 2005.

DE LORGERIL, J. et al. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3438–3445, 2008.

DESTOUMIEUX-GARZON, D. et al. Antimicrobial Peptides in Marine Invertebrate Health and Disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 371, n. 1695, 2016.

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, D. et al. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **The 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. **European journal of biochemistry**, v. 346, 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, n. 3, p. 461–469, 2000.

DUHACHEK-MUGGY, S. et al. Alternative mRNA Splicing Generates Two Distinct ADAM12 Prodomain Variants. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2020. FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nation; fisheries and aquaculture department**, 2020.

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.

FINGERHUT, L. C. H. W. et al. ampir: an R package for fast genome-wide prediction of antimicrobial peptides. **Bioinformatics (Oxford, England)**, 2020.

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 & Comparative Immunology**, v. 25, n. 7, p. 565–577, 2001.

GRÜTTER, M. G. et al. The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. **The EMBO journal**, v. 7, n. 2, p. 345–351, 1988.

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

HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, n. 6, p. 951–959, 2007.

HETRU, C.; BULET, P. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 78, n. 2, p. 35–49, 1997.

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

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

KUMAR, S. et al. TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 7, p. 1812–1819, 2017.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LAZZARO, B. P.; ZASLOFF, M.; ROLFF, J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. v. 487, n. May, 2020.

LI, F. et al. A double WAP domain-containing protein from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* with antimicrobial activities against Gram-negative bacteria and yeast. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 36, n. 1, p. 183–190, 2012.

- LI, S. et al. A Double WAP Domain-Containing Protein Es-DWD1 from *Eriocheir sinensis* Exhibits Antimicrobial and Proteinase Inhibitory Activities. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–15, 2013.
- LIU, H. T. et al. Identification and expression analysis of a novel stylicin antimicrobial peptide from Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 47, n. 2, p. 817–823, 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. **Methods**, v. 25, 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, n. 2, p. 197–202, 2008.
- LONKA-NEVALAITA, L. et al. Characterization of the intracellular localization, processing, and secretion of two glial cell line-derived neurotrophic factor splice isoforms. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 34, p. 11403–11413, 2010.
- 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, p. 1–17, 2018.
- MCKENNA, M. Antibiotic resistance: The last resort. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 394–396, 2013.
- MOGENSEN, T. H. et al. Innate immune recognition and activation during HIV infection. **Retrovirology**, v. 7, n. May 2014, 2010.
- MORITA, T. et al. Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). **Journal of Biochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1611–1620, 1985.
- 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.
- NAGOSHI, H. et al. Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 13, p. 2061–2069, 2006.
- NETTO, L. E. S. et al. Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 180–193, 2007.
- PATRZYKAT, A.; DOUGLAS, S. E. Gone gene fishing: How to catch novel marine antimicrobials. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 362–369, 2003.
- PETTIT, G. R. et al. The Isolation and Structure of a Remarkable Marine Animal Antineoplastic Constituent: Dolastatin 10. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 22, p. 6883–6885, 1987.

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 & modelling**, v. 17, n. 2, p. 106–113, 134–136, 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, n. 6, 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. 1, 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.

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

SHOCKEY, J. E. et al. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 5, p. 668–673, 2009.

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

SMITH, V. J. et al. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 7, 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, n. 5, p. 1403–1408, 2011.

SPERSTAD, S. V. et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 519–530, 2011.

SRIVASTAVA, S. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides from plants: The future of antimicrobial therapy. **Phytotherapy Research**, n. July, p. 1–22, 2020.

TAM, J. P. et al. Antimicrobial peptides from plants. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 711–757, 2015.

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**, v. 13, n. 4, p. 639–657, 2011.

TSUNEMI, M. et al. Crystal structure of an elastase-specific inhibitor elafin complexed with porcine pancreatic elastase determined at 1.9 Å resolution. **Biochemistry**, v. 35, n. 36, p. 11570–11576, 1996.

WANG, X. W. et al. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11779–11790, 2014.

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

WANG, Z.; BURGE, C. B. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. **RNA**, v. 14, n. 6, p. 802–813, 2008.

WORAMONGKOLCHAI, N.; SUPUNGUL, P.; TASSANAKAJON, A. The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infection. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 5, p. 530–536, 2011.

WU, B. et al. Identification and function of penaeidin 3 and penaeidin 5 in *Fenneropenaeus merguensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 89, n. April, p. 623–631, 2019.

XIAO, B. et al. Penaeidins restrict white spot syndrome virus infection by antagonizing the envelope proteins to block viral entry. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 390–412, 2020.

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.

ZHANG, K. et al. A novel white spot syndrome virus-induced gene (MjVIG1) from *Marsupenaeus japonicus* hemocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 77, n. December 2017, p. 46–52, 2018.

ZHANG, X. et al. Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.