



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Natanael Dantas Farias

**ANÁLISE DO PERFIL E DOS SÍTIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS (AMPS) DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

Florianópolis
2021

Natanael Dantas Farias

**ANÁLISE DO PERFIL E DOS SÍTIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS (AMPS) DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Coorientador: Profa. Dra. Luciane M. Perazzolo

Florianópolis

2021

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

Farias, Natanael

Análise do perfil e dos sítios de expressão gênica dos peptídeos antimicrobianos (AMPS) do camarão *Litopenaeus vannamei* / Natanael Farias ; orientador, Rafael Diego da Rosa, coorientadora, Luciane Maria Perazzolo, 2021.
117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Peptídeos Antimicrobianos. 3. Stylicinas. 4. Sistema Imune. 5. *Litopenaeus vannamei*. I. Diego da Rosa, Rafael. II. Maria Perazzolo, Luciane. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Natanael Dantas Farias

**ANÁLISE DO PERFIL E DOS SÍTIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS (AMPS) DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

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

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Danielle Maria Perpétua de Oliveira Santos
Universidade Federal do Rio de Janeiro

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa
Orientador(a)

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

À UFSC pelo apoio estrutural e à CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro, ambos muito necessários para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, o qual fiz parte para obtenção do título, em especial aos professores Andréa Trentin, Giordano, Evelise, Geison, Carmen e Luciane Ouriques pelas ótimas disciplinas oferecidas.

Ao LAMEB pelo acolhimento e auxílio no manuseio dos equipamentos, em especial a Shirley, Emily, Maísa, Vanessa, Laise, Elis, Denis e William, funcionários que tive maior contato.

Aos membros da banca examinadora, profs. Mirella, Ricardo, Danielle, Luis e Norma por terem aceito o convite de avaliação desta tese.

Ao meu orientador prof. Rafael e minha coorientadora Luciane Perazzolo pela atenção e dedicação em desenvolver esse projeto, em especial na mudança de planos no meio do doutorado, que me fez voltar o brilho nos olhos da ciência. Agradeço também pela confiança depositada, pela paciência e pelos ensinamentos que irei levar pra vida.

Aos meus amigos Cairé, Gabriel, Mariana, Nicolas, Maiara e Gabriel Pescador por todos os momentos de risadas, aprendizado e paciência (bota paciência) dentro do laboratório, principalmente pelas conversas formais e informais que me ajudaram a me colocar no eixo.

À profa. Claudia Nedel e ao Anderson, cujos desenvolvi uma amizade incrível, por todos os momentos que passamos juntos, seja na UFSC ou fora dela.

Ao Marco, Gabriela e Felipe, pela amizade e pelos Natais. Em especial ao Felipe por morar a 4 anos comigo e nesta última fase a me ajudar de maneira inenarrável em Florianópolis.

Por fim e não menos importante, muito pelo contrário à minhas famílias adotiva e biológica, as quais amo demais.

RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) codificados por gene representam um importante componente do sistema imune inato dos camarões. Eles podem ser divididos em quatro famílias (peneidinas, crustinas, fatores anti-lipopolissacarídeos ou ALFs e stylicinas) que possuem diferentes membros. Em *Litopenaeus vannamei* a família das stylicinas ainda não foi descrita, sendo o primeiro objetivo desta tese (capítulo 1). Sendo assim, foram descritos dois membros aniônicos (*Lvan-Stylicin1* e *Lvan-Stylicin2*) com características próprias da família. Interessantemente, as stylicinas foram encontradas pela primeira vez no interior de células intestinais, não sendo exclusivamente hemocitárias. O capítulo 2 desta tese descreveu aspectos genômicos dos AMPs, como a localização e organização gênica, além dos níveis de transcrição basal e a localização hemocitária de todas as quatro famílias de AMPs (*Litvan* PEN1/2, PEN3 e PEN4; *Litvan* ALF-A, -B, -C, -D, -E, -F e -G; Crustin *Lv* e Crustin-like *Lv*; *Lvan-Stylicin1* e *Lvan-Stylicin2*). Foi identificado que o gene *PEN3* possui o maior nível de transcrição da família peneidina e dentre todos os AMPs avaliados, seguido dos genes Crustin *Lv*, *ALF-B* e *STY2*. A distribuição dos AMPs nos hemócitos foi bem diversificada para cada membro analisado. Os membros da família peneidina e da família crustina foram mais expressos em hemócitos granulares, possuindo expressão semelhante em hemócitos semigranulares e hialinos. Os ALFs possuíram expressão bem diversificada de acordo com o tipo analisado, sendo os *Litvan* ALF-B, -D e -E os que possuíram expressão semelhante entre os tipos celulares. Os membros *Litvan* ALF-A e -C possuíram expressão maior em hemócitos hialinos e semigranulares e quase nenhuma em granulares. O *Litvan* ALF-G foi o membro menos expresso da família, contudo, sua maior expressão foi em hemócitos hialinos e semigranulares. A família stylicina possuiu maior expressão em hemócitos semigranulares. A expressão em indivíduos não-manipulados é diversificada de acordo com o tipo de AMP analisado. Os AMPs mais presentes são mais expressos em hemócitos granulares, enquanto que os demais são expressos em hemócitos semigranulares e hialinos, respectivamente. Esses dados sugerem que os hemócitos granulares são as células responsáveis pela defesa imediata e produção dos principais AMPs.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. *Litopenaeus vannamei*. Hemócitos. Stylicinas. Expressão basal.

ABSTRACT

Gene-encoded antimicrobial peptides (AMPs) represent an important component of shrimp innate immune system. They can be divided into four families (penaeidins, crustins, anti-lipopolsaccharides factor or ALFs and stylicins) that have different members. In *Litopenaeus vannamei* the stylicin family has not yet been described, which is the first objective of this thesis (chapter 1). Thus, two anionic members (*Lvan-Stylicin1* and *Lvan-Stylicin2*) with specific characteristics to the family were described. Interestingly, stylicins were found for the first time inside intestinal cells, not being exclusively hemocytic. Chapter 2 of this thesis evaluated several genomic aspects of AMPs, such as gene location and organization, in addition to basal transcription levels and hemocytic location of all four AMP families (*Litvan* PEN1/2, PEN3 and PEN4; *Litvan* ALF-A; -B, -C, -D, -E, -F and -G; Crustin *Lv* and Crustin-like *Lv*; *Lvan-Stylicin1* and *Lvan-Stylicin2*). It was identified that the *PEN3* gene has the highest transcription level of the penaeidin family and among all the AMPs evaluated, followed by the Crustin *Lv*, *ALF-B* and *STY2* genes. The distribution of AMPs in hemocytes was well diversified for each analyzed member. The members of the penaeidin family and the crustin family were more expressed in granular hemocytes, having similar expression in semigranular and hyaline hemocytes. The ALFs had a well-diversified expression according to the type analyzed, being the *Litvan* ALF-B, -D and -E those that had similar expression among the cell types. *Litvan* ALF-A and -C members had greater expression in hyaline and semigranular hemocytes and almost none in granular ones. *Litvan* ALF-G was the least expressed member of the family; however, its highest expression was in hyaline and semigranular hemocytes. The stylicin family had greater expression in semigranular hemocytes. The expression in unmanipulated individuals varies according to the type of AMP analyzed. The most present AMPs are more expressed in granular hemocytes, while the others are expressed in semigranular and hyaline hemocytes, respectively. These data suggest that granular hemocytes are the cells responsible for the immediate defense and production of the main AMPs.

Keywords: Antimicrobial peptides. *Litopenaeus vannamei*. Haemocytes. Stylicins. Basal expression.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral e Estado da Arte

Figura 1 – Sistema gastrointestinal de camarões.....	20
Figura 2 – Micrografias eletrônicas de hemócitos de camarão.....	23
Figura 3 – Reações celulares de defesa desencadeadas após o reconhecimento de microrganismos.....	24
Figura 4 – Peneidinas.....	26
Figura 5 – Fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs).....	27
Figura 6 – Crustinas.....	29
Figura 7 – Stylicinas.....	30
Figura 8 – Estágios do desenvolvimento de <i>L. vannamei</i>	36

Capítulo 1

Figure 1 – Nucleotide and deduced amino acids sequence and alignments.....	54
Figure 2 – Schematic representation of stylicin genes from <i>Litopenaeus vannamei</i>	55
Figure 3 – Amino acid sequence alignments and phylogenetic analysis of stylicins.....	57
Figure 4 – Gene expression distribution of <i>Litopenaeus vannamei</i> stylicins.....	58
Figure 5 – Immunodetection of <i>Lvan</i> -Stylicin peptides in shrimp tissues by immunohistochemistry.....	59
Figure 6 - Quantitative comparison of the relative abundance of <i>Lvan</i> -Stylicin1 and <i>Lvan</i> -Stylicin2.....	60
Figure 7 - Relative gene expression profile of <i>Lvan</i> -Stylicin1 and <i>Lvan</i> -Stylicin2.....	61
Figure 8 - Relative gene expression profile of <i>Lvan</i> -Stylicin1 and <i>Lvan</i> -Stylicin2 in shrimp midgut.....	62
Figure 9 - Gene expression profile of <i>Litopenaeus vannamei</i> stylicins during shrimp development.....	63

Capítulo 2

Figura 1 – Localização e organização dos genes codificantes das peneidinas.....	73
Figura 2 – Localização e organização dos genes codificantes das stylicinas.....	75
Figura 3 – Localização e organização dos genes codificantes dos ALFs.....	76
Figura 4 – Localização e organização dos genes codificantes das crustinas.....	78
Figura 5. Porcentagem dos níveis de transcritos de cada família de AMP nos hemócitos de <i>L. vannamei</i>	80

Figura 6 – Níveis de expressão gênica basal dos três membros da família das peneidinas expressos nos hemócitos de <i>L. vannamei</i>	82
Figura 7 – Níveis de expressão gênica basal dos seis membros da família dos ALFs expressos nos hemócitos de <i>L. vannamei</i>	83
Figura 8 – Níveis de expressão gênica basal das crustinas do Tipo IIa e IIb expressas nos hemócitos de <i>L. vannamei</i>	84
Figura 9 – Níveis de expressão gênica basal dos dois membros da família das stylicinas expressos nos hemócitos de <i>L. vannamei</i>	85
Figura 10 – Distribuição da expressão de peneidinas nas populações hemocitárias.....	87
Figura 11 – Distribuição da expressão de ALFs nas populações hemocitárias.....	88
Figura 12 – Distribuição da expressão de crustinas nas populações hemocitárias.....	89
Figura 13 – Distribuição da expressão de stylicinas nas populações hemocitárias.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Listagem dos iniciadores utilizados neste trabalho	40
Tabela 1 – Relação entre os números de cópias de mRNA de cada peptídeo comparado a outro	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALF Fatores anti-lipopolissacarídeos

AMPs *AntiMicrobial Peptides* (Peptídeos antimicrobianos)

ATCC *American Type Culture Collection*

bp *Basepair* (pares de base)

cDNA DNA complementar

CDS *Coding Sequence* (sequência codificante)

CFU *Colony Forming Units* (unidades formadoras de colônia)

Cq Ciclo de quantificação

dNTPs Deoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EST *Expressed Sequence Tag* (Etiqueta de sequência expressa)

ET *Extracellular Traps* (armadilhas extracelulares)

FAO Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

Gb *Giga base pair*

gDNA Dna genômico

kb *Kilo base pair*

kDa kilodaltons

LPS Lipopolissacarídeos

MAS Solução de Alsever Modificada

Mb *Mega base pair*

mRNA Rna mensageiro

pb Pares de base

pI ponto isoelétrico teórico

PvHCT *Hemocyanin-derived peptides* (peptídeo derivado da hemocianina)

RNAi RNA de interferência

ROS *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)

RT-PCR Transcrição reversa seguida de PCR convencional

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

SPLI *Secretory Leukocyte Protease Inhibitors* (Inibidores de Proteases Secretados por Leucócitos)

SSW *Sterile Sea Water* (água do mar estéril)

SWD *Single Wap Domain* (Proteínas contendo um domínio WAP)

TSA *Transcriptome Shotgun Assembly*

WAP *Whey Acidic Protein*

WGS *Whole-Genome Shotgun Contigs*

WSSV *White Spot Syndrome Virus* (Vírus da Síndrome da Mancha Branca)

L - litro

mL – mililitro

µL – microlitro

g – grama

µg – micrograma

µM – micromolar

mM - milimolar

DO – densidade óptica

U – unidade de atividade enzimática

v/v – diluição volume/volume

h – hora(s)

min – minuto(s)

s

–

segundo(s)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius

< - maior

> - menor

% - porcentagem

α - letra grega alfa

β - letra grega beta

Δ - letra grega delta

μ - micro

\pm - mais ou menos

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO GERAL	16
II.	ESTADO DA ARTE	19
II.1.	Sistema imune de camarões	20
II.2.	Peptídeos antimicrobianos (AMPs) de camarões peneídeos	24
II.2.1	Peneidinas	25
II.2.2	Fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)	26
II.2.3	Crustinas	28
II.2.4	Stylicinas	29
II.2.5	Peptídeos antimicrobianos não-convencionais de camarões	31
II.3.	Participação dos AMPs nas respostas de defesa de camarões	31
III.	OBJETIVOS	33
III.1.	Objetivo geral	34
III.2.	Objetivos específicos	34
IV.	METODOLOGIA	35
IV.1.	Animais	36
IV.2.	Coleta de animais em diferentes estágios do desenvolvimento e coleta de tecidos	36
IV.3.	Infecções experimentais	37
IV.4.	Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA	38
IV.5.	Clonagem molecular	39
IV.6.	Caracterização das sequências das stylicinas	42
IV.7.	Organização e localização dos AMPs no genoma	42
IV.8.	Análises <i>in silico</i> da expressão dos AMPs nos diferentes tipos de hemócitos	43
IV.9.	Análises de expressão gênica	43

IV.9.1	Análises semiquantitativas de distribuição da expressão gênica.....	43
IV.9.2.	Análises quantitativas de expressão gênica por RT-qPCR.....	44
IV.10.	Quantificação absoluta dos genes <i>Lvan-STY1</i> e <i>Lvan-STY2</i>	45
IV.11.	Quantificação absoluta dos transcritos.....	45
IV.12.	Imunohistoquímica.....	46
IV.12.1	Preparo dos tecidos.....	46
IV.12.2	Imunodeteção.....	46
IV.13.	Imunofluorescência in toto.....	46
V.	RESULTADOS	48
Capítulo 1	<i>Litopenaeus vannamei</i> stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections.....	49
1.	Introduction.....	51
2.	Materials and Methods.....	52
3.	Results.....	52
3.1.	<i>L. vannamei</i> stylicins comprise a diverse AAMP family.....	52
3.2.	<i>L. vannamei</i> stylicins are encoded by distinct genomic loci.....	54
3.3.	Stylicins cluster into three distinct phylogenetic groups.....	56
3.4.	Stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells.....	57
3.5.	<i>Lvan-STY1</i> and <i>Lvan-STY2</i> genes are simultaneously transcribed in a single shrimp at different basal levels.....	60
3.6.	The gene expression of <i>L. vannamei</i> stylicins is differentially modulated in response to infections.....	61
3.7.	<i>L. vannamei</i> stylicins show a different pattern of gene expression during shrimp development.....	63
4.	Discussion.....	63
5.	Conclusions.....	66

References.....	67
Capítulo 2 Análise transcricional dos peptídeos antimicrobianos do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	70
1. Introdução.....	71
2. Material e Métodos.....	72
3. Resultados e Discussão.....	72
3.1. Mapeamento e organização estrutural dos genes codificantes de AMPs do camarão <i>L. vannamei</i>	72
3.2. Expressão basal comparativa dos AMPs de <i>L. vannamei</i>	79
3.3. Determinação dos tipos hemocitários que expressam os AMPs de <i>L. vannamei</i>	85
VI. DISCUSSÃO GERAL.....	92
VII. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	97
VII.1. Conclusões.....	98
VII.2. Perspectivas.....	98
REFERÊNCIAS.....	100
APÊNDICES.....	110
ANEXOS.....	113

I. INTRODUÇÃO GERAL

A carcinicultura é um ramo da aquicultura que consiste no cultivo de camarões em sistemas isolados e controlados. O camarão peneídeo *Litopenaeus vannamei* possui ótimas características zootécnicas (elevadas taxas de crescimento e tolerância a altas densidades, a salinidades extremas e a variações de temperatura) (BRIGGS et al., 2004), sendo atualmente a espécie mais cultivada no mundo (FAO, 2021). Contudo, nos últimos anos, a sustentabilidade dos cultivos tem sido desafiada devido à ocorrência de doenças infecciosas que levam a perdas econômicas na escala de bilhões de dólares (THITAMADEE et al., 2016). Dentre essas doenças, destacam-se as causadas por vírus, sendo o mais importante o vírus causador da síndrome da mancha branca ou WSSV (do inglês, *White Spot Syndrome Virus*) e por cepas patogênicas de bactérias do gênero *Vibrio* (KIBENGE, 2019; LIGHTNER et al., 2012). Essas bactérias e vírus causam mortalidades de até 100% nos cultivos em poucos dias, podendo também acometer diferentes fases de desenvolvimento dos animais (LIGHTNER et al., 2012). Algumas infecções podem ocorrer de maneira sistêmica, afetando as células imunocompetentes dos camarões, os hemócitos, o que leva ao comprometimento do seu sistema imunológico (WANG et al., 2002). As infecções bacterianas geralmente ocorrem em órgãos mais específicos, como o hepatopâncreas (análogo ao fígado dos mamíferos), como no caso da bacteriose emergente chamada Síndrome da Necrose Aguda Hepatopancreática (do inglês, *Acute HepatoPancreatic Necrosis Disease*, AHPND), causada por diferentes espécies de vibrionáceas, incluindo cepas específicas de *Vibrio parahaemolyticus* (ARANGUREN CARO et al., 2020; TRAN et al., 2013).

Dentro da problemática do desenvolvimento de doenças nos cultivos, métodos alternativos de cultivo têm sido aplicados na tentativa de aumentar a imunocompetência dos camarões e, conseqüentemente, melhorar as suas respostas de defesa frente aos patógenos, como o cultivo em bioflocos (PILOTTO, 2019). Outros métodos, como a utilização de antibióticos sintéticos, não são eficazes em cultivos por serem compostos altamente tóxicos para o meio ambiente, além de aumentar a resistência de bactérias ambientais. Os antibióticos ainda podem deixar os animais impróprios para consumo humano (MOLINA-AJA et al., 2002). Com isso, a funcionalidade dos antibióticos naturais como os peptídeos antimicrobianos ou AMPs (do inglês, *AntiMicrobial Peptides*), tem sido amplamente investigada (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016). Sabe-se também que diversos AMPs podem ser específicos contra determinados microrganismos, podendo agir diretamente sobre suas paredes celulares ou até mesmo em seu interior. Essas ações levam a efeitos microbicidas de maneira semelhante aos antibióticos sintéticos (BROGDEN, 2005; WILMES et al., 2011).

Nos camarões peneídeos, foram identificadas e caracterizadas quatro famílias de AMPs codificadas por genes: peneidinas, fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs), crustinas e stylicinas. Apesar dos esforços recentes na elucidação do envolvimento dos AMPs nas respostas de defesa de camarões (MATOS; ROSA, 2021), pouco ainda se conhece a respeito das stylicinas, a única família que apresenta membros exclusivamente aniônicos. Ao contrário dos demais AMPs, as stylicinas foram caracterizadas apenas em duas espécies: *Litopenaeus stylirostris* (ROLLAND et al., 2010) e *Marsupenaeus japonicus* (LIU et al., 2015). Além disso, pouco ainda se conhece a respeito dos sítios de expressão e do perfil transcricional de AMPs em camarões peneídeos. Assim, esta tese propõe identificar e caracterizar, em nível molecular e transcricional, novos membros da família das stylicinas na espécie de camarão peneídeo mais cultivado do mundo (*L. vannamei*) e analisar o perfil de expressão gênica hemocitária dos diferentes membros das quatro famílias de AMPs de camarões.

II. ESTADO DA ARTE

II.1. Sistema imune de camarões

O sistema imune dos camarões é considerado do tipo inato devido à ausência de linhagens linfocíticas, de anticorpos e de memória imunológica, classicamente presentes no sistema imune adaptativo. Inicialmente, os camarões contam com defesas não imunológicas, como as barreiras físicas externas (carapaça rígida de quitina e uma camada quitinosa que reveste quase todo o intestino) para impedir o acesso dos microrganismos à cavidade corpórea (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

O sistema gastrointestinal dos camarões peneídeos é uma importante barreira físico-química de defesa contra microrganismos invasores. Sua morfologia é tubular, apresentando uma abertura anterior (boca) e outra posterior (ânus). Esse sistema pode ser dividido em três partes principais: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (do inglês: *foregut*, *midgut* e *hindgut*, respectivamente) (SOONTHORNCHAI et al., 2010). Anatomicamente, o intestino anterior consiste na conexão do esôfago ao estômago e inclui parte do hepatopâncreas (**Fig. 1**, *foregut*). O intestino médio inclui o *caecum* anterior, o canal intestinal e o *caecum* posterior, sendo ambos os *caeca* extensões do intestino (**Fig. 1**, *midgut*). Por fim, o intestino posterior conecta o intestino médio ao ânus dos animais (**Fig. 1**, *hindgut*) (SOONTHORNCHAI et al., 2015).

Figura 1 – Sistema gastrointestinal de camarões.

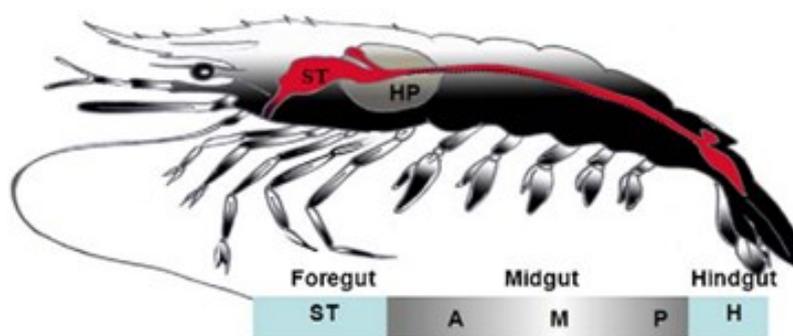


Figura esquemática em escala não representativa mostrando o trato gastrointestinal do camarão marinho *Penaeus monodon*. O esôfago, juntamente com o estômago (ST) compõem o intestino anterior (*foregut*). O hepatopâncreas (HP) é uma glândula que recobre a parte inicial do intestino médio (*midgut*) que, por sua vez, consiste na porção mais central do intestino, sendo composto pelo *caecum* anterior e posterior. O intestino médio pode ser dividido ainda em uma porção anterior, medial e posterior (A, M e P, respectivamente). O intestino posterior (*hindgut*; H) consiste na conexão do intestino médio ao ânus (adaptado de SOONTHORNCHAI et al., 2010).

As porções que equivalem ao intestino anterior e posterior são protegidas por uma cutícula quitinosa impermeável e semelhante à estrutura da carapaça dos crustáceos, que funciona como uma barreira física. O intestino médio, por sua vez, é revestido por uma membrana peritrófica acelular e porosa, composta também de quitina, glicoproteínas e mucinas, o que a torna semipermeável e passível à absorção de nutrientes, mas também torna essa região mais suscetível à infecção por microrganismos (SOONTHORNCHAI et al., 2015).

Assim como ocorre em outros invertebrados aquáticos, o intestino dos camarões é naturalmente colonizado por uma grande variedade de microrganismos. Esses microrganismos, chamados coletivamente de microbiota intestinal, participam do desenvolvimento, nutrição, intensificação da resposta imune e até na resistência a alguns patógenos (APPRILL, 2017; SOONTHORNCHAI et al., 2015). Quando ocorre o desequilíbrio dessas comunidades microbianas, como exemplo o aumento da quantidade de espécies de bactérias oportunistas do gênero *Vibrio*, que também fazem parte da microbiota natural, pode haver o desenvolvimento de alguma doença (BACHÈRE et al., 2004; LIGHTNER et al., 2012). Em *L. vannamei*, as comunidades microbianas do intestino são facilmente alteradas em virtude do tipo de água do cultivo e em casos de infecções com vírus WSSV e bactérias do gênero *Vibrio* (PILOTTO et al., 2018). Essas alterações podem levar a um aumento na incidência de doenças, como no caso das vibrioses já citadas (SILVEIRA et al., 2018). Alguns mecanismos são sugeridos para controlar a microbiota endobionte dos camarões, dentre eles, destacam-se a produção e liberação de enzimas, espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*, ROS) e também de peptídeos antimicrobianos (do inglês, *antimicrobial peptides*, AMPs) (YANG et al., 2015b, 2016). Esses mecanismos geralmente são associados unicamente à atuação e liberação dessas moléculas por parte dos hemócitos no intestino e raramente associa-se ao sistema imune relacionado aos epitélios, como no caso de células intestinais, visto que os hemócitos são encontrados infiltrados no intestino (SILVEIRA et al., 2018). Em *Drosophila melanogaster*, sabe-se que microrganismos ingeridos podem desencadear a produção de AMPs e outros componentes imunológicos pelas células do epitélio intestinal, indicando uma função imunológica não-hemocitária (BUCHON; BRODERICK; LEMAITRE, 2013). Em camarões, sabe-se que alguns AMPs podem também ser produzidos por outras células, como algumas crustinas e ALFs, produzidos pelas brânquias e órgão linfoide (BARRETO et al., 2018; LI et al., 2019; SUN et al., 2021).

Quando ultrapassadas essas barreiras físico-químicas iniciais, os microrganismos têm que se evadir de células e diversas moléculas que compõem o sistema imune, bem como de uma série de reações imunológicas complexas que têm a finalidade de neutralizar esses microrganismos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2007). Como parte do sistema imunológico, os camarões possuem células de defesa chamadas de hemócitos que estão presentes na hemolinfa, um líquido análogo ao sangue dos vertebrados. A hemolinfa percorre um sistema circulatório semiaberto onde, além das células imunocompetentes, estão presentes diversas moléculas solúveis. Essas moléculas são capazes de dar sequência a uma série de reações imunológicas como a cascata da profenoloxidase. Quando ativada por patógenos via proteínas de reconhecimento padrão (do inglês, *Pattern-Recognition Proteins*, PRPs), a cascata produz melanina e algumas moléculas tóxicas, como as ROS, culminando na melanização do tecido e destruição do microrganismo, respectivamente (AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013). Outras proteínas podem se encontrar solúveis, como a proteína de coagulação, envolvida em processos fisiológicos. Essa proteína é ativada por enzimas transglutaminases e coagulam a hemolinfa localmente, impedindo a disseminação de microrganismos ao longo do corpo do animal e prevenindo o extravasamento de hemolinfa para o meio extracorpóreo (CHANG et al., 2016; MUTA; IWANAGA, 1996).

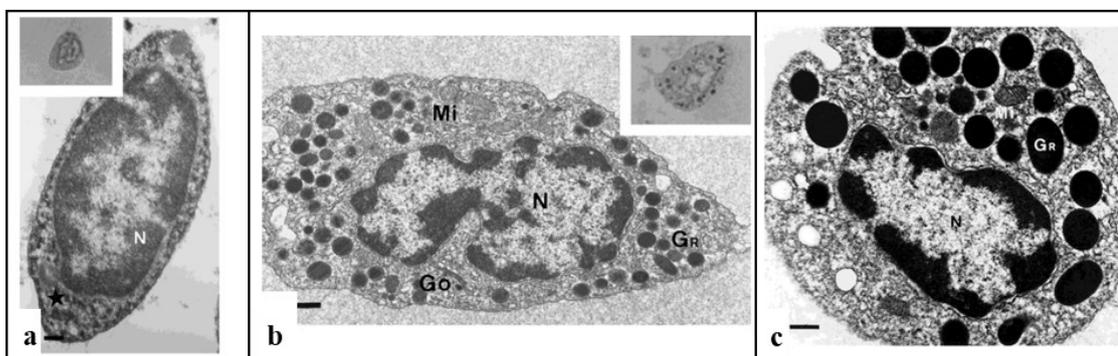
Os hemócitos dos crustáceos, incluindo lagostins e camarões peneídeos, são morfológicamente distintos e classificados em três populações principais: hemócitos hialinos (HH), hemócitos semigranulares (HSG) ou de grânulos pequenos e hemócitos granulares (HG) ou de grânulos grandes (SÖDERHÄLL, 2016). Utilizando a tecnologia de RNAseq *single cell*, Koiwai et al.(2021) identificaram seis subpopulações hemocitárias na hemolinfa de *M. japonicus*, que provavelmente representam três populações de hemócitos hialinos e três populações de hemócitos granulares (semigranulares e granulares).

Os hemócitos hialinos (**Figs. 2A e 2D**) são morfológicamente as menores células com uma alta relação núcleo:citoplasma e apresentam poucos ou nenhum grânulo (GARGIONI; BARRACCO, 1998). Esse tipo celular é o maior responsável pelo início da cascata de coagulação, visto que são as células que mais produzem enzimas transglutaminases (CHANG et al., 2016; YANG et al., 2015a). Alguns autores indicam que esse tipo celular não realiza fagocitose, participando apenas na sinalização celular para o sistema imunológico (GARGIONI; BARRACCO, 1998; KOIWAI et al., 2021) e outros indicam que é o tipo celular que mais fagocita (MUÑOZ et al., 2002).

Os hemócitos semigranulares (**Figs. 2B e 2E**) são células maiores, com baixa relação núcleo:citoplasma e que apresentam pequenos grânulos citosólicos (GARGIONI;

BARRACCO, 1998). Sua função no sistema imune, juntamente com os hemócitos granulares é a formação de nódulos e cápsulas para isolar e matar os patógenos, além de produzir e liberar moléculas microbicidas como as ROS e estocar os peptídeos antimicrobianos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014; DESTOUMIEUX et al., 2000; LIU et al., 2020). Os hemócitos granulares (Figs. 2C e 2F) possuem uma baixa relação núcleo:citoplasma e um tamanho relativamente próximo aos HSG. O HG morfologicamente diferencia-se do HSG por possuir grandes grânulos citosólicos (GARGIONI; BARRACCO, 1998). Alguns autores ainda indicam que esse é o tipo celular que mais realiza fagocitose (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Figura 2 – Micrografias eletrônicas de hemócitos de camarão



As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostram os três principais tipos de hemócitos circulantes encontrados no camarão marinho *Farfantepenaeus paulensis*. (a) Hemócitos hialinos, (b) Hemócitos semigranulares ou de grânulos pequenos e (c) Hemócitos granulares. Adaptado de Gargioni & Barracco (1998).

Como brevemente explicado, cada hemócito possui uma função que contribui para a defesa imunológica, desde a fagocitose de microrganismos à formação de nódulos e cápsulas (respostas celulares) e a produção e liberação de moléculas imunoefetoras/imunoreguladoras, como os peptídeos antimicrobianos (resposta humoral) (Fig. 3).

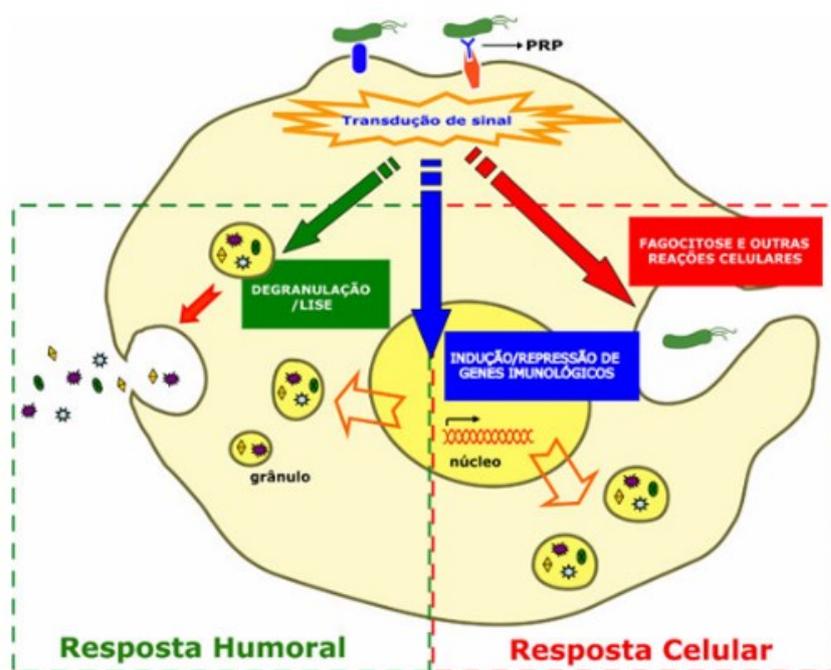
A fagocitose dos microrganismos é uma reação mais controlada que ocorre quando um hemócito endocita um ou poucos microrganismos através de interações mais específicas com os receptores hemocitários, para posterior destruição intracelular (BARRACCO, 2004; LIU et al., 2020).

Quando os microrganismos invasores entram em uma quantidade maciça nos camarões ou quando o seu tamanho é muito maior que o de um hemócito, pode-se desencadear a formação de nódulos e cápsulas, respectivamente. A formação ultraestrutural dos dois processos é bastante similar, contudo, a nodulação refere-se à formação de agregados

celulares que aprisionam um grande número de microrganismos, como bactérias. A formação de cápsulas refere-se à ligação de hemócitos a organismos maiores, como nematoides, que são impossíveis de serem fagocitados. O processo final de ambos mecanismos consiste nos hemócitos circundando os microrganismos em camadas e exocitando moléculas citotóxicas (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

Um outro mecanismo descoberto mais recentemente é a formação das armadilhas extracelulares (do inglês, *Extracellular Traps*, ETs) ou ETose (NG et al., 2013). Nessa reação os hemócitos liberam sua cromatina juntamente com histonas para o meio extracelular de tal maneira que forma uma rede de filamentos que aprisionam e matam os microrganismos. Esse processo é combinado com a liberação de peptídeos antimicrobianos e outros componentes citotóxicos (KOIWA et al., 2016; NG et al., 2013).

Figura 3 – Reações de defesa desencadeadas após o reconhecimento de microrganismos



A figura esquemática mostra as reações de defesa dos hemócitos. As células podem agir diretamente sobre o microrganismo, fagocitando, formando cápsulas ou nódulos, bem como exocitar (degranular) moléculas como os peptídeos antimicrobianos. Este último fará parte da resposta humoral. Reproduzido de Barracco; Perazzolo & Rosa (2007).

II.2. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) de camarões peneídeos

Os AMPs são classicamente descritos como moléculas catiônicas, anfipáticas, com massa molecular inferior a 10 kDa e que podem ser codificadas por genes ou não, esses últimos também chamados de peptídeos antimicrobianos não-convencionais (SMITH;

DESBOIS; DYRYNDA, 2010). Em camarões peneídeos, os AMPs codificados por genes estão divididos em quatro grandes famílias: as peneidinas (DESTOUMIEUX et al., 1997), os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) (GROSS et al., 2001), as crustinas (BARTLETT et al., 2002) e as stylicinas (ROLLAND et al., 2010). Essas famílias são todas multigênicas e são constitutivamente expressas nos hemócitos. Os peptídeos possuem peptídeo-sinal e geralmente são estocados nos grânulos intracelulares dos hemócitos. Cada família possui uma assinatura molecular no peptídeo que consiste em resíduos aminoacídicos conservados que caracterizam bioquimicamente cada peptídeo e, conseqüentemente a família (ROSA; BARRACCO, 2010).

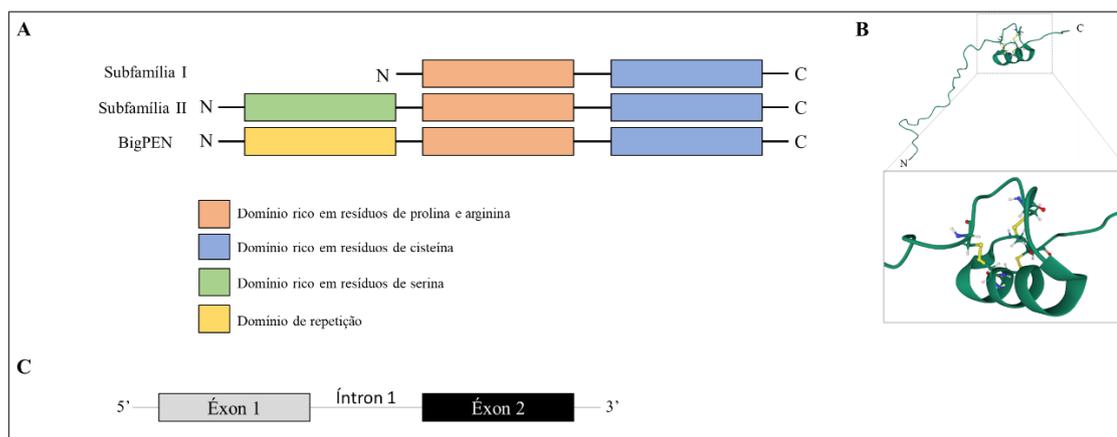
II.2.1. Peneidinas

As peneidinas foram inicialmente descritas em *L. vannamei* e estão presentes exclusivamente em camarões peneídeos (DESTOUMIEUX et al., 1997). Após a sua síntese, podem sofrer ainda modificações pós-traducionais, como a ciclização do resíduo de glutamina N-terminal em ácido piroglutâmico e a amidação da sua extremidade C-terminal (DESTOUMIEUX et al., 1997). Para essa família, foram descritos até então seis membros, divididos em duas subfamílias (**Fig. 4A**). A subfamília I é composta por todas as peneidinas com região rica em prolina e cisteína: PEN1/2, PEN3 (DESTOUMIEUX et al., 1997), PEN4 (CUTHBERTSON et al., 2002), PEN5 (KANG et al., 2007) e BigPEN (XIAO et al., 2020). No caso da última peneidina descrita, a BigPEN, além de possuir as regiões ricas em prolina e cisteína, possui um domínio N-terminal de repetição (XIAO et al., 2020). Todas essas peneidinas são codificadas por um gene distinto com organização estrutural muito semelhante: dois éxons separados por um íntron (**Fig. 4C**) (WU et al., 2019). A subfamília II é composta pela peneidina *MjPen-II* que, diferente da subfamília I, possui uma região rica em serina na região N-terminal (AN et al., 2016). A organização gênica da subfamília II e da BigPEN ainda não foi descrito na literatura. Cada membro possui uma assinatura aminoacídica própria e pode ser espécie-específico (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016). Enquanto que o gene *PEN3* está presente na maioria das espécies, os genes *PEN1/2* e *PEN4* foram identificados nos gêneros *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus* e o gene *PEN5* nos gêneros *Penaeus* e *Fenneropenaeus* (TASSANAKAJON et al., 2010). A BigPEN, por outro lado, foi apenas descrita em *L. vannamei* (XIAO et al., 2020) enquanto que *MjPen-II* apenas em *Marsupenaeus japonicus* (AN et al., 2016).

Todas as peneidinas são peptídeos catiônicos, com ponto isoelétrico (pI) de aproximadamente 9 e massa molecular entre 4,7-7,2 kDa (subfamília I), 14 kDa (*MjPenII*) e

29,22 kDa (BigPEN) (AN et al., 2016; CUTHBERTSON et al., 2002; DESTOUMIEUX et al., 1997; KANG et al., 2007; XIAO et al., 2020). O peptídeo maduro é composto por um domínio N-terminal linear, rico em resíduos de prolina e arginina, seguido de um domínio C-terminal que contém uma α -hélice anfipática e seis resíduos conservados de cisteína, que formam três pontes dissulfeto (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016) (**Fig. 4B**).

Figura 4 – Peneidinas



Representação esquemática da família das peneidinas. (A) Desenho esquemático da estrutura primária de cada subfamília. PEN1/2, PEN3, PEN4 e PEN5 são membros da subfamília I, enquanto que *MjPen-II* é membro da subfamília II. A BigPEN está representada como um terceiro grupo de peneidinas. (B) Estrutura terciária da *Litvan* PEN3 de *Litopenaeus vannamei*, resolvida por Yang et al. (2003) e retirada de <https://www.rcsb.org/3d-view/1UEO/undefined>. As seis cisteínas do peptídeo formam três pontes dissulfeto. (C) Estrutura gênica das peneidinas da subfamília I: dois éxons separados por um íntron.

A ampla diversidade das peneidinas reflete o seu amplo espectro de atividade antimicrobiana. Enquanto as peneidinas dos subgrupos PEN1/2, PEN3 e PEN4 possuem atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos, as do subgrupo PEN5 apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016). O membro *MjPen-II* apresenta atividade contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AN et al., 2016) enquanto que BigPEN também possui atividade contra vírus envelopados (XIAO et al., 2020).

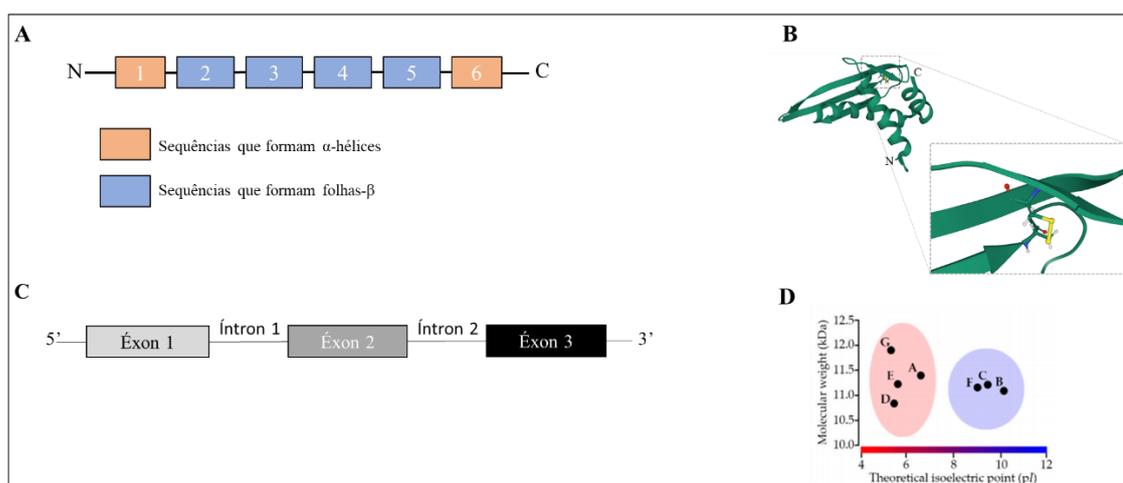
II.2.2. Fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)

Os ALFs foram a segunda família de AMPs descoberta em camarões peneídeos (*L. setiferus*) (GROSS et al., 2001), contudo foram originalmente descobertos na hemolinfa dos limulídeos *Limulus polyphemus* e *Tachypleus tridentatus* (TANAKA et al., 1982), o que

demonstra que sua distribuição não é exclusiva de camarões penéides (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016; GROSS et al., 2001). Em penéides foram descritos sete membros com duas sequências que formam α -hélices e quatro que formam folhas- β (Fig. 5A), denominados de Grupos A a G (MATOS et al., 2018). Os ALFs não são espécie-específicos e os diferentes membros estão amplamente distribuídos entre as espécies de penéides.

Diferentemente das peneidinas, os ALFs possuem membros aniônicos (ALF-A, -D, -E e -G) e catiônicos (ALF- B, -C e -F) com assinaturas aminoacídicas próprias (Fig. 5D). O peptídeo maduro possui valores de pI que variam entre 5,02-10,29 e massa molecular entre 11,04-12,23 kDa (MATOS et al., 2018). Esse peptídeo maduro é composto por aproximadamente 98 aminoácidos e possui duas cisteínas que formam uma ponte dissulfeto que, por sua vez, forma um grampo na estrutura tridimensional com atividade antimicrobiana (Fig. 5B) (MATOS et al., 2018). Assim como as peneidinas, cada ALF é codificado por um gene, com organização estrutural semelhante: três éxons separados por dois íntrons (Fig. 5C) (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016; MATOS et al., 2018). Os membros dessa família apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos filamentosos e vírus envelopados (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016), além de se sugerir o controle da microbiota presente na hemolinfa de camarões (PONPRATEEP et al., 2012).

Figura 5 – Fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)



Representação esquemática da família dos ALFs. (A) Desenho esquemático da estrutura primária dos membros (ALF-A ao ALF-G). (B) Estrutura terciária de ALFPm3 de *Penaeus monodon*, resolvida por Yang et al. (2009) e retirada de <https://www.rcsb.org/3d-view/2JOB>. As duas cisteínas formam uma ligação dissulfeto entre as folhas- β provenientes das sequências 3 e 4. (C) Estrutura gênica dos ALFs: três éxons separados por dois íntrons. (D) Propriedades bioquímicas dos ALFs, extraído de Matos et al. (2018). Os ALFs -A, -D, -E e -G são peptídeos aniônicos e possuem diferentes massas moleculares. Os ALF-B, -C e -F são peptídeos catiônicos e possuem massa molecular semelhante.

II.2.3. Crustinas

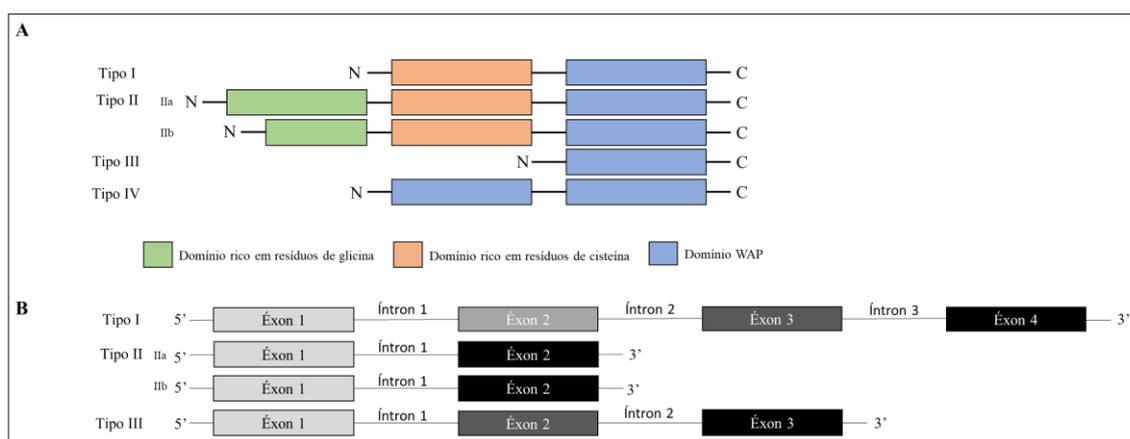
As crustinas foram a terceira família de AMPs descrita em camarões peneídeos, sendo originalmente identificadas em hemócitos do caranguejo *Carcinus maenas* (RELF et al., 1999) e, posteriormente identificada (GROSS et al., 2001) e caracterizada em *L. vannamei* e *L. setiferus* (BARTLETT et al., 2002), o que faz com que sua distribuição não seja exclusiva de camarões peneídeos. Essa família é muito diversa e composta por diversos membros que são divididos em quatro grupos: crustinas do Tipo I, Tipo II, Tipo III e Tipo IV (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007; SMITH et al., 2008; TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). As crustinas do Tipo I são encontradas principalmente em crustáceos da subordem Pleocyemata, como os caranguejos, lagostas e lagostins (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007). As do Tipo II e III são encontradas principalmente em crustáceos da subordem Dendrobranchiata, como os camarões peneídeos (TASSANAKAJON et al., 2010). As crustinas do Tipo IV estão distribuídas em diferentes espécies de crustáceos (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015).

Seus peptídeos maduros são majoritariamente catiônicos, com valores de pI entre 5-8 e massa molecular entre 6-22 kDa. Sua sequência aminoacídica contém 12 resíduos de cisteínas, sendo oito presentes num domínio chamado WAP (do inglês, *Whey Acidic Protein*), localizado na região C-terminal e quatro num outro domínio rico em cisteínas (N-terminal). O domínio WAP é conservado na família e pode ser caracterizado por possuir um núcleo com quatro ligações dissulfeto realizadas entre as oito cisteínas (SMITH et al., 2008). Ambos os domínios descritos, além de caracterizar as crustinas, podem dividi-las em pelo menos quatro tipos (**Fig. 6A**) (BARRETO et al., 2018; DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016; SMITH et al., 2008). As crustinas do Tipo I apresentam apenas um domínio rico em resíduos de cisteína e um domínio WAP. As do Tipo II, diferenciam-se por possuírem um domínio N-terminal adicional rico em resíduos de glicina. Esse grupo pode ser dividido em dois subgrupos, são eles: Tipo IIa e Tipo IIb. As crustinas do Tipo IIa apresentam um domínio rico em glicina de maneira muito semelhante entre as espécies do gênero *Litopenaeus*. As do Tipo IIb por sua vez, são conhecidas como “Crustin-like”, pois são peptídeos homólogos ao CruFc do *Fenneropenaeus chinensis* e a Crus-likePm do *P. monodon*. Enquanto as crustinas do Tipo IIa tem sido identificada em diferentes peneídeos, as do Tipo IIb foram encontradas apenas em espécies orientais. As do Tipo III e IV diferenciam-se das demais por possuírem apenas um ou dois domínios WAP, respectivamente (**Fig. 6A**) (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007; SMITH et al., 2008; TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015).

A organização gênica dessa família é muito diversa e, embora cada tipo seja codificado por um gene, podem compreender subtipos com quatro éxons separados por três íntrons (Tipo I), três éxons separados por dois íntrons (Tipo III) e dois éxons separados por um íntron (Tipo II) (**Fig. 6B**) (BARRETO et al., 2018; TASSANAKAJON et al., 2010). A organização gênica das crustinas do tipo IV ainda não foram descritas.

Os membros dessa família são bem descritos por possuírem atividade antimicrobiana contra diversos tipos de bactérias Gram-positivas (TASSANAKAJON et al., 2013). No entanto, alguns membros podem possuir atividade tanto contra bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas (BANDEIRA et al., 2020) e outras crustinas podem possuir atividade ainda mais restrita, como no caso da crustin*Pm7*. Essa crustina possui atividade contra bactérias Gram-negativas, especificamente contra *V. harveyi* e alguns fungos filamentosos (TASSANAKAJON et al., 2010, 2013). Interessantemente, crustinas do Tipo III e IV mostram ainda atividades antiproteases (TASSANAKAJON et al., 2010; TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015) Recentemente, foi identificado que as crustinas são produzidas por populações de hemócitos específicas, sendo majoritariamente produzidas e expressas nos hemócitos granulares e semi-granulares do camarão *Farfantepenaeus paulensis* (BANDEIRA et al., 2020).

Figura 6 –Crustinas



Representação esquemática da família das crustinas. (A) Desenho esquemático da estrutura primária de cada tipo (Tipo I ao Tipo IV). (B) Estrutura gênica das crustinas.

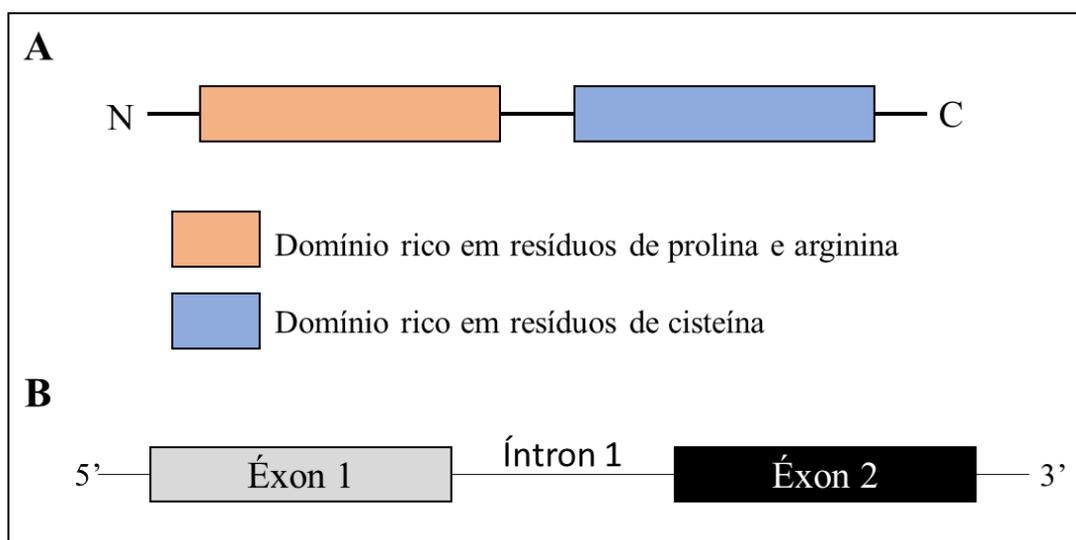
II.2.4. Stylicinas

As stylicinas representam a quarta e última família de AMPs descrita nos camarões peneídeos, sendo a família menos conhecida até o momento. Elas foram inicialmente identificadas em hemócitos do camarão *L. stylirostris* (DE LORGERIL et al., 2005) e

posteriormente classificada em uma nova família (ROLLAND et al., 2010). As poucas descrições existentes dos membros dessa família compreendem as espécies *L. stylirostris* (ROLLAND et al., 2010), *Marsupenaeus japonicus* (LIU et al., 2015) e, descrito nesta tese, *L. vannamei* (FARIAS et al., 2019). Sendo assim, subtende-se que essa família seja exclusiva de camarões peneídeos. Em *L. stylirostris*, essa família é composta por dois membros: Stylicina 1 e Stylicina 2, enquanto que *M. japonicus* possui apenas um membro (LIU et al., 2015; ROLLAND et al., 2010). Os membros dessa família são exclusivamente aniônicos com valores de pI entre 4,47-5,7 e massa molecular de aproximadamente 9 kDa. O peptídeo maduro das stylicinas não possui domínios muito claros, contudo possui uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e uma região C-terminal com 13 resíduos de cisteína (Fig. 7A) (ROLLAND et al., 2010). Até o momento, sabe-se que a Stylicina1 é codificada por um gene contendo dois éxons separados por um íntron (Fig. 7B) (ROLLAND et al., 2010). A organização gênica da Stylicina 2 é desconhecida.

A Stylicina1 possui uma forte atividade contra fungos filamentosos (*Fusarium oxysporum*) e pouca atividade contra bactérias Gram-negativas (*Vibrio* sp.). Além dessa atividade, a Stylicina1 é capaz de promover a aglutinação de bactérias *Vibrio penaeicidae*, provavelmente por se ligar a componentes da parede celular dessas bactérias. Para isso, Rolland et al. (2010) verificaram que ocorre uma ligação forte entre a Stylicina 1 e lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede de bactérias Gram-negativas.

Figura 7 – Stylicinas



Representação esquemática da família das stylicinas. (A) Desenho esquemático da estrutura primária da Stylicina 1 e Stylicina 2. (B) Estrutura gênica das stylicinas: dois éxons separados por 1 íntron.

II.2.5. Peptídeos antimicrobianos não-convencionais de camarões

Os AMPs não codificados por genes e designados como “não-convencionais” compõem moléculas provenientes da hidrólise de algum precursor que, inicialmente, possui uma outra função no animal. Os AMPs mais conhecidos são derivados de histonas, proteínas ribossomais e da hemocianina (ROSA; BARRACCO, 2010; SMITH; DESBOIS; DYRYNDA, 2010).

No caso da hemocianina, sua principal função nos crustáceos é transportar oxigênio através de sua ligação ao cobre (VAN HOLDE; MILLER; DECKER, 2001). Em *L. vannamei*, a porção C-terminal da hemocianina pode ser clivada em um peptídeo aniônico (PvHCT) que tem atividade contra fungos filamentosos (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2001). As histonas são proteínas envolvidas principalmente na arquitetura da cromatina dos eucariontes. Como citado anteriormente (item II.1), sua função imunológica está associada à liberação da cromatina e histonas numa reação celular de defesa chamada de ETose. Nessa reação os hemócitos liberam sua cromatina juntamente com histonas, formando uma armadilha extracelular que imobiliza e, associadas à outras reações celulares como as espécies reativas de oxigênio, matam bactérias (NG et al., 2013). Alguns peptídeos podem ainda ser liberados da subunidade menor (40S) dos ribossomos e apresentar atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SMITH; DESBOIS; DYRYNDA, 2010).

II.3. Participação dos AMPs nas respostas de defesa de camarões

Os AMPs representam um mecanismo de defesa importante associado ao sistema imune do tipo inato. Seu mecanismo de ação é bastante diversificado e vários modelos foram propostos (BROGDEN, 2005). Alguns AMPs podem atuar diretamente sobre a membrana plasmática de microrganismos através de interações eletrostáticas com os fosfolípidios aniônicos. Esse mecanismo clássico de ação pode levar à desestabilização da membrana plasmática, de forma que o peptídeo retire pedaços da membrana semelhantemente à ação de detergentes ou essa interação pode levar à formação de poros e, conseqüentemente, ao extravasamento do conteúdo intracelular (BROGDEN, 2005). Outros AMPs podem se ligar a componentes da superfície do microrganismo ou ainda serem interiorizados, inibindo vias metabólicas intracelulares essenciais (BROGDEN, 2005; WILMES et al., 2011).

Os AMPs não estão envolvidos apenas na imunidade direta dos camarões, eles também podem controlar a microbiota dos invertebrados marinhos, como no caso dos ALFs (PONPRATEEP et al., 2012). Foi identificado que o silenciamento de AMPs, como o ALFPm3 do camarão *P. monodon*, causa uma alteração no número de bactérias presentes na

hemolinfa e no hepatopâncreas, ocasionando uma rápida mortalidade de camarões (PONPRATEEP et al., 2012). Em *L. vannamei*, o silenciamento do ALF-A, seguido de desafios com baixas doses de patógenos (a bactérias *V. penaeicida* e o fungo *F. oxysporum*) causam um aumento na mortalidade dos camarões (DE LA VEGA et al., 2008). A expressão basal de alguns AMPs, como a PEN1/2, PEN3, ALF-D e crustinas do Tipo II pode ser correlacionada com a capacidade dos animais de sobreviver a infecções causadas por *V. penaeicida*. (DE LORGERIL et al., 2008; DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016). AMPs como a PEN3 podem ainda estar associados à hematopoiese, visto que a diminuição da expressão desse peptídeo é correlacionada com a diminuição de hemócitos circulantes (SÖDERHÄLL, 2016).

Pelo fato da família das stylicinas ser a única até então não descrita em *L. vannamei*, esta tese se propõe inicialmente a identificá-la e descrevê-la tanto em nível genômico quanto em características proteicas, para posteriormente analisar o perfil transcricional basal de diversos membros dos AMPs em hemócitos camarões saudáveis. Essas informações se fazem necessárias para compreensão do comportamento dos AMPs e serve de base para adoção de manejo mais adequado e permitindo a seleção de animais mais resistentes ao cultivo.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar stylicinas, comparando o perfil transcricional dos diferentes membros das quatro famílias de peptídeos antimicrobianos (peneidinas, crustinas, ALFs e stylicinas) nos hemócitos de camarões *Litopenaeus vannamei* adultos e em diferentes estágios larvais no desenvolvimento.

III.2. Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar, em nível molecular e transcricional, membros da família das stylicinas no camarão *L. vannamei*;
- Localizar os sítios de expressão das stylicinas nas diferentes fases do desenvolvimento e em animais adultos;
- Determinar a organização e o número de cópias dos genes codificantes de AMPs no genoma de *L. vannamei*;
- Quantificar e comparar os níveis de expressão gênica basal dos diferentes membros das quatro famílias de AMPs nos hemócitos de animais adultos;
- Identificar as populações hemocitárias que expressam cada uma das famílias de AMPs de camarões peneídeos.

IV. METODOLOGIA

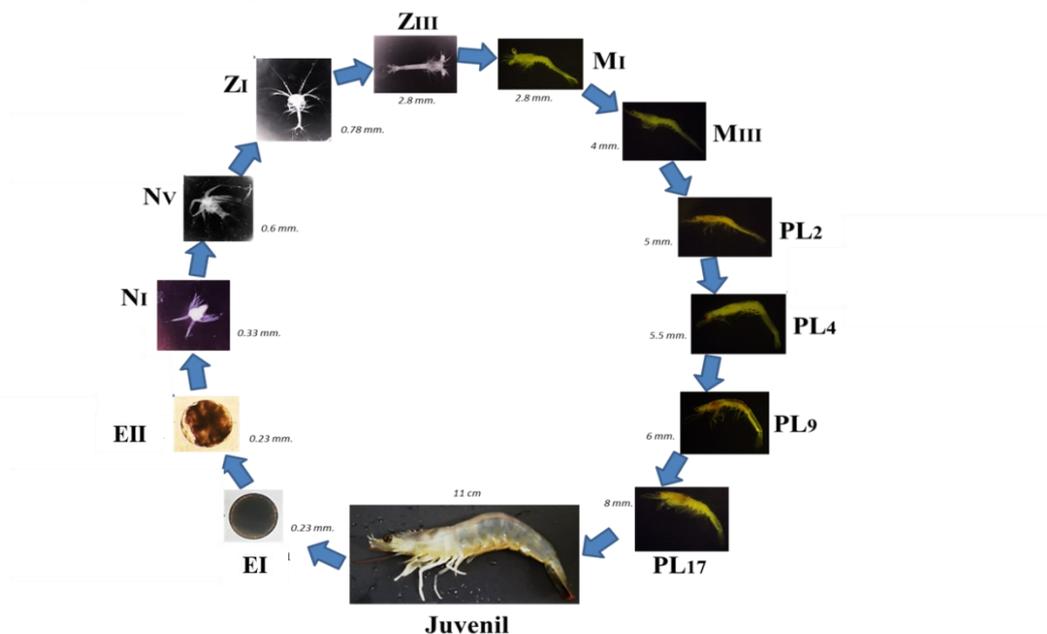
IV.1. Animais

Camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* (10 ± 2 g) foram obtidos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM, UFSC) e transportados para o setor de aquários do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA, UFSC). No laboratório, os animais foram aclimatados por sete dias em aquários com aeração constante e água salgada renovada diariamente em 30%. Os camarões foram alimentados $2\times$ ao dia com ração comercial *ad libitum* e todos os experimentos foram realizados após o período de aclimação.

IV.2. Coleta de animais em diferentes estágios do desenvolvimento e coleta de tecidos

Amostras de camarões em diferentes estágios de desenvolvimento foram preparadas conforme descrito em Quispe et al. (2016), para se identificar a partir de qual estágio as stylicinas estariam presentes. Em resumo, cada estágio foi identificado microscopicamente e três amostras independentes foram coletadas de cada estágio, como segue: ovos fertilizados em 0-4 h (EI) e 7-11 h pós-desova (EII), náuplios I e V (NI e NV), protozoetas I e III (ZI e ZIII), misis I e III (MI e MIII) e pós-larvas com idades de 2, 9 e 17 dias (PL2, PL9 e PL17).

Figura 8 - Estágios do desenvolvimento de *L. vannamei*



As figuras representam os estágios de desenvolvimento de *L. vannamei* utilizados para extração de RNA total. EI representam os ovos fertilizados em 0-4 h, EII os ovos 7-11 h pós-desova, NI e NV os náuplios I e V, ZI e ZIII as protozoetas I e III, MI e MIII as misis I e III e, por fim PL2, PL9 e PL17, representam as pós-larvas com idades de 2, 9 e 17 dias.

Além disso, coletou-se diferentes tecidos de camarões juvenis (n=5) após 48 h de estímulo bacteriano por injeção intramuscular de 100 µL de uma solução contendo 5×10^7 unidades formadoras de colônia (do inglês, *Colony-Forming Units*, CFU)/animal, da bactéria Gram-negativa marinha *Vibrio harveyi* ATCC 14126, inativada por calor (70 °C por 20 min). Animais não manipulados (grupo “naïve”) foram utilizados como controle (n=5). A hemolinfa de cada grupo de animais foi retirada após 48 h do estímulo, com auxílio de seringa (1 mL) contendo solução anticoagulante (Solução de Alsever modificada ou MAS: 27 mM de citrato de sódio, 336 mM NaCl, 115 mM glicose e 9 mM EDTA, pH 7,0) na proporção de 2:1 (MAS:hemolinfa). Os hemócitos foram separados do plasma por centrifugação (800 ×g por 10 min a 4 °C) e os camarões foram sacrificados por hipotermia (banho de gelo por 10 min) para coleta dos seguintes tecidos/órgãos: brânquias, músculo, cordão nervoso, hepatopâncreas, intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Todos os tecidos e estágios larvais foram lavados em solução Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4), homogeneizados em TRIzol (Thermo Scientific) e imediatamente processados para extração de RNA. Pleópodos de camarões do grupo *naïve* foram coletados e processados para extração de DNA genômico (gDNA). Esse material foi utilizado para as análises semiquantitativas de distribuição da expressão gênica e caracterização a nível genômico das stylicinas.

Para as análises quantitativas de expressão gênica basal, cinco indivíduos não manipulados (*naïve*) tiveram a hemolinfa coletada e processada, como previamente descrito e o RNA total dos hemócitos foi obtido como descrito no item IV.4.

IV.3. Infecções experimentais

Para as análises quantitativas de expressão gênica, os animais foram desafiados com dois patógenos de interesse aquícola, separadamente, a bactéria Gram-negativa marinha *V. harveyi* ATCC 14126 e o vírus causador da Síndrome da Mancha Branca (do inglês *White spot syndrome virus*, WSSV). Para a infecção bacteriana, foi utilizada uma dose previamente padronizada como capaz de matar 50% dos animais infectados em dois dias (LD50/2) (SILVEIRA et al., 2018). Essa dose correspondeu a 6×10^7 CFU/animal (n=15) de *V. harveyi* ATCC 14126 em 100 µL de água do mar filtrada (do inglês *Sterile Sea Water*, SSW). Como controle da injúria causada pela perfuração, um grupo de animais (n=15) foi injetado com 100 µL de SSW. No caso da infecção viral, um grupo de camarões (n=15) foi injetado com uma dose previamente padronizada como capaz de matar 50% dos animais infectados em quinze dias (3×10^2 partículas virais/animal em 100 µL de SSW) (SILVEIRA et al., 2018). Para o preparo desse inóculo viral, em resumo, tecidos (abdome) de camarões infectados foram

homogeneizados em uma solução de Tris-NaCl estéril (330 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4) (1:10 w/v) utilizando pistilos. A mistura foi centrifugada ($2000 \times g$, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 μm (GONCALVES et al., 2014). Como controle da infecção viral, um grupo de animais ($n=15$) foi injetado com 100 μL de um macerado de tecido muscular livre de WSSV. Todas as injeções foram conduzidas intramuscularmente na face dorsal dos camarões. Após 48 h da infecção, a hemolinfa e o intestino médio foram coletados, misturados (3 *pools* de 5 animais/condição/tecido) e processados para extração de RNA total. Animais não manipulados (grupo “naive”) foram utilizados como controle para todos os experimentos.

Num terceiro experimento, para se avaliar a distribuição das stylicinas em diferentes secções do intestino, um grupo de camarões ($n=3$) foi desafiado pela administração oral de $7,5 \times 10^5$ CFU/animal de *V. harveyi* ATCC 14126 em 50 μL de SSW. Como controle, 3 animais receberam apenas SSW. O desafio bacteriano *per os* foi realizado conforme descrito por Pilotto et al. (2018). Após 21 h do desafio, o intestino médio dos animais foi coletado individualmente e seccionado em três porções iguais (anterior, médio e posterior) para a extração de RNA total.

IV.4. Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA

Para a extração de gDNA, os pleópodos foram individualmente homogeneizados em 500 μL de tampão de lise [100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 100 mM NaCl, 50 mM EDTA (pH 8,0), 1% SDS, 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proteinase K] e incubados por 1 h a 55 °C. Posteriormente, foi adicionado 3 M de acetato de potássio (1:2; v:v) e as amostras foram incubadas por 30 min a 4 °C. Após centrifugação ($14.000 \times g$ por 10 min), o gDNA foi precipitado com isopropanol, lavado com álcool 70% e tratado com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase A (Fermentas) por 30 min a 37 °C. O gDNA foi então precipitado com 0,3 M de acetato de sódio (pH 5.2) e isopropanol (1:1; v:v). Finalmente, o gDNA foi lavado com etanol 75% gelado e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases. A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria (NanoVue; Biochrom) e a qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Para a extração de RNA total, foi adicionado clorofórmio nas amostras preservadas em TRIzol (Thermo Scientific), seguido de uma centrifugação a $12.000 \times g$ por 15 min a 4 °C. O RNA total foi precipitado com isopropanol e lavado 2 \times com etanol 75% gelado. O RNA obtido foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases, tratado com 1 U da enzima DNase I (Thermo Scientific) por 15 min a 37 °C e precipitado com 0,3 M de acetato de sódio (pH 5.2) e isopropanol (1:1; v:v). Finalmente, o RNA purificado foi lavado com

etanol 75% gelado e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases. A quantificação de RNA foi realizada por espectrofotometria (NanoVue; Biochrom) e a qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), as amostras de RNA foram desnaturadas por calor (70 °C por 5 min) e a transcrição reversa realizada utilizando o kit RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). Em resumo, foi utilizado 1 µg do RNA total e 50 ng/µL oligo(dT)₁₂₋₁₈ numa reação de 20 µL contendo a enzima transcriptase reversa, de acordo com especificações do fabricante.

IV.5. Clonagem molecular

As reações de PCR para os experimentos de clonagem molecular foram feitas em um volume de 15 µL contendo 50-100 ng de gDNA (pleópodos) ou 1 ng/µl de cDNA (hemócitos), 2 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP Mix, 0,4 µM de cada iniciador (**Tab. 1**) e 1 U de Taq DNA Polimerase (Sinapse). As condições de PCR foram: 1 ciclo de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 45 s, 55-60 °C por 45 s e 72 °C por 2 min e extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram ligados em vetores do Tipo TA [pCR2.1-TOPO (Thermo Scientific) ou pGEM-t-easy Vector System I (Promega)], seguindo as instruções de cada fabricante.

Em seguida, os produtos de ligação foram transformados em bactérias *Escherichia coli* DH5α quimio-competentes que foram inoculadas em meio líquido LB (Luria Bertani: 3 g de peptona bacteriológica, 1,5 g de extrato de levedura e 1% de NaCl, pH 7,3). Posteriormente, as bactérias foram semeadas em meio sólido LB-NaCl 1% pré-aquecido com ampicilina (100 µg/mL) e X-GAL (20 µg/mL) e incubadas a 37 °C por período *overnight*. Por fim, as colônias de coloração branca foram subclonadas num novo meio sólido LB-NaCl 1% com ampicilina (100 µg/mL) e submetidas à técnica de PCR-*colony* (iniciadores M13-Fw: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' e M13-Rv: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'). As condições de PCR foram: 1 ciclo de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo.

Tabela 1 – Listagem dos iniciadores utilizados neste trabalho

Gene	GenBank	Iniciadores (5'-3')	Amplicon
Clonagem molecular			
<i>Litvan</i> ALF-A	GETD01024664	Fw: CGACGATGCGAGTCTTGGTC Rv: AGACAAGGGCTTCAGTGCTC	379 pb
<i>Litvan</i> ALF-B	DQ208704	Fw: CTTTCYTAGTTTAGAAGATGCG Rv: GAGAGGGCCCGTTAGTTCAG	397 pb
<i>Litvan</i> ALF-C	GETD01033447	Fw: CAAGATGCGAGTGTCAAGTCC Rv: CTTTCGCCTTAACTATTAAGC	380 pb
<i>Litvan</i> ALF-D	FE115964	Fw: TCTACAATGGGTTTGAGTTC Rv: CTAAGGTATCATACGAGGTG	389 pb
<i>Litvan</i> ALF-E	FE069658	Fw: AGAGACAAGATGGCGTCAAC Rv: CCCTAGAGATACTCTGTAGC	386 pb
<i>Litvan</i> ALF-F	KJ000049	Fw: AGAAATGAAGCTCTCACTAC Rv: TCAATCACTTGTTAAGCCAC	378 pb
<i>Litvan</i> ALF-G	GETZ01049665	Fw: CCGCTGCATGTCAAGTATCC Rv: TGCAACCGGTCAATGGTTCC	496 pb
<i>Litvan</i> PEN1/2	Y14925	Fw: CGCTCCGAGCCCGGGTCCCTC Rv: TGGCAAATATTCTCTCCCTCG	508 pb
<i>Litvan</i> PEN3	AF390144	Fw: CGCTCCGAGCCCGGGTCCCTC Rv: CAGGATCACAGGCTCTTCAC	354 pb
<i>Litvan</i> PEN4	AF390147	Fw: CGCTCCGAGCCCGGGTGCCTC Rv: ACCAGATTATCCTAAATGAC	422 pb
Crustin <i>Lv</i> (Tipo IIa)	AY488496	Fw: GGCAAGTTTCGCGGCTTCGGAC Rv: TCATCCGAAAACCTGCGATC	438 pb
Crustin-like <i>Lv</i> (Tipo IIb)	JQ824114	Fw: CAGGATAAAGACAAGGCCGG Rv: CACATGCAGGCTTATCCCTGAG	422 pb
<i>Lvan</i> -Stylicin1	FE124653	Fw: CTGGACGCATCCCTGCTG Rv: TGCGCCTTCGTTCTCTTTATCC	571 pb
<i>Lvan</i> -Stylicin2	GETD01027083	Fw: GCTGTACTGCTCCTGTGTAG Rv: CTTTCGTTCTCGCTTCTTTATCC	589 pb
Distribuição tecidual da expressão gênica			
<i>Lv</i> Actin	AF300705	Fw: TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG Rv: TCACCAACTGGGATGACATGG	846 pb
<i>Lvan</i> -Stylicin1	MH108957	Fw: CACAAGAGTGCCCACCGTG Rv: ACATTCGCAGTTATGGTAGCC	125 pb
<i>Lvan</i> -Stylicin2	MH108958	Fw: CACAAGAGTGCCCACCGTG	151 pb

Rv: CACACAGGCTGCCGACATAA

PCR quantitativa em tempo real			
<i>LvActin</i>	AF300705	Fw: CCACGAGACCACCTACAAC Rv: AGCGAGGGCAGTGATTTC	142 pb
<i>LvEF1α</i>	GU136229	Fw: TGGCTGTGAACAAGATGGACA Rv: TTGTAGCCACCTTCTTGACG	103 pb
<i>LvL40</i>	KJ831563	Fw: GAGAATGTGAAGGCCAAGATC Rv: TCAGAGAGAGTGCGACCATC	104 pb
<i>LvRpS3A</i>	BF023924	Fw: GGCTTGCTATGGTGTGCTCC Rv: TCATGCTCTTGGCTCGCTG	101 pb
<i>LvRpS6</i>	FE080516	Fw: AGCAGATACCCTTGGTGAAG Rv: GATGCAACCACGGACTGAC	193 pb
<i>Litvan ALF-A</i>	EW713395	Fw: CTGATTGCTCTTGTGCCACG Rv: TGACCCATGAACTCCACCTC	113 pb
<i>Litvan ALF-B</i>	GQ227486	Fw: GTGTCTCCGTGTTGACAAGC Rv: ACAGCCCAACGATCTTGCTG	123 pb
<i>Litvan ALF-C</i>	FE058235	Fw: ATGCGAGTGTCTGTCCTCAG Rv: TGAGTTTGTTCGCGATGGCC	115 pb
<i>Litvan ALF-D</i>	FE151634	Fw: TGTGTTGGTTGTGGCACTGG Rv: CAACGAGGTCAATGTCACCG	131 pb
<i>Litvan ALF-E</i>	FE069658	Fw: TGCTACGTGAATCGCAGTCC Rv: CGCTTCCTCTCCGACAATG	100 pb
<i>Litvan ALF-F</i>	KJ000049	Fw: AAGCTCTCATTCTGGTCCG Rv: GGGTGTAACGAAGTACGTGC	180 pb
<i>Litvan ALF-G</i>	FE153496	Fw: CCGCTGCATGTCAAGTATCC Rv: TCAGCAGTAGCAGTGTGACG	140 pb
<i>Litvan PEN1/2</i>	Y14925	Fw: GTCTGCCTGGTCTTCTTGG Rv: GCAGCAATTGCGAGCATCTG	168 pb
<i>Litvan PEN3</i>	AF390144	Fw: TGGTCTTCTTGGCCTCCTTC Rv: GCGCTTGTGAGAAGGAAATTC	178 pb
<i>Litvan PEN4</i>	AF390147	Fw: GTCTGCCTGGTCTTCTTGG Rv: TTGCGGAGGGAATTCCGTAG	142 pb
<i>Crustin Lv</i> (Tipo IIa)	AY488496	Fw: CGAACCAGAGACACCTGTTG Rv: CAGCACACTTGTAGTCGTTG	113 pb
<i>Crustin-like Lv</i> (Tipo IIb)	JQ824114	Fw: GCAGGATAAAGACAAGGC Rv: GTAATTGCAGTTGAATCCGCC	199 pb
<i>Lvan-Stylicin1</i>	MH108957	Fw: CACAAGAGTGCCCACCGTG Rv: ACATTCGCAGTTATGGTAGCC	125 pb

<i>Lvan-Stylicin2</i>	MH108958	Fw: CACAAGAGTGCCCACCGTG	151 pb
		Rv: CACACAGGCTGCCGACATAA	

Y: base pirimídica (C ou T). Fw: do inglês, *Forward* (senso). Rv: do inglês, *Reverse* (anti-senso).

Após confirmação do tamanho esperado dos insertos por PCR *colony*, as bactérias foram inoculadas em meio LB-NaCl 1% líquido suplementado com ampicilina (100 µg/mL) por período *overnight* a 37 °C sob constante agitação para posterior extração de DNA plasmidial com o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), segundo instruções do fabricante. Todos os plasmídeos foram sequenciados em ambas as direções no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB, UFSC) no equipamento DNA ABI3500.

IV.6. Caracterização das sequências das stylicinas

Para a busca de stylicinas em *L. vannamei*, foram utilizadas sequências descritas nos camarões *L. stylirostris* (*Lsty-Stylicin1*: EU177435; *Lsty-Stylicin2*: EU177437) e *M. japonicus* (*Mjap-Stylicin*: KR063277). As buscas foram realizadas em bancos de dados públicos disponíveis: *Expressed Sequence Tags* (EST), *Transcriptome Shotgun Assembly* (TSA) e *Whole-Genome Shotgun Contigs* (WGS). Somente sequências completas foram incluídas. As buscas por homologia foram realizadas utilizando a ferramenta *tBLASTX* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Todas as sequências nucleotídicas foram manualmente conferidas e traduzidas utilizando a ferramenta *ExpPASy Translate Tool* (<http://web.expasy.org/translate/>). A predição de peptídeo sinal foi realizada pelo programa *SignalP 4.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e o ponto isoelétrico teórico (*pI*) e a massa molecular (MW, do inglês *Molecular Weight*) dos peptídeos maduros foram preditos pelo programa *ExpPASy ProtParam Tool* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Todos os alinhamentos de sequências nucleotídicas ou aminoacídicas para construção das árvores foram realizados no programa MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Por fim, as árvores filogenéticas foram obtidas no programa MEGA X, utilizando o método estatístico *Maximum Likelihood* com 1.000 replicatas. Os sítios contendo *gaps* entre as sequências foram desconsiderados previamente à reconstrução das árvores.

IV.7. Organização e localização dos AMPs no genoma

A organização e localização dos AMPs no genoma foram determinados a partir de sequências de cDNA originais da tabela de iniciadores (**Tab. 1**). Inicialmente foram retiradas

todas as bases que não condiziam com a sequência do peptídeo, de tal forma que foi utilizado apenas a sequência condizente ao peptídeo sinal e maduro. Para isso, a sequência foi traduzida utilizando a ferramenta *ExPASy Translate Tool* (<http://web.expasy.org/translate/>). Posteriormente, a busca pelas sequências no genoma de *L. vannamei* (ZHANG et al., 2019) foi realizada inicialmente no banco de dados públicos de nucleotídeos utilizando a ferramenta de busca tBLASTX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências anotadas previamente foram identificadas e foi buscada sua sequência original no genoma (NW_020872875.1). Em seguida, foi identificada a sequência gênica, a sequência correspondente ao RNAm e a região codificadora (CDS, do inglês, *coding sequence*). Por fim, foi verificado quantos éxons e íntrons a sequência de gDNA possuía, bem como qual era o sentido da codificação.

IV.8. Análises *in silico* da expressão dos AMPs nos diferentes tipos de hemócitos

Bibliotecas de RNA-seq dos diferentes tipos de hemócitos do camarão *L. vannamei*, depositadas sob o n° PRJNA520779 (SUN et al., 2020), foram baixadas do banco de dados SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) utilizando o SRA toolkit v2.10.5 (<http://ncbi.github.io/sra-tools/>). A qualidade das sequências foi verificada utilizando o FastQC v.0.11.9 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e qualquer sequência de adaptadores ou bases com qualidade-*score* inferior a 30 foram removidos utilizando o software Trimmomatic v0.39 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). A análise de expressão gênica foi realizada utilizando o software RSEM v1.3.3 (LI; DEWEY, 2011) e com o software STAR v2.7.3 (DOBIN et al., 2013) como software de mapeamento. As sequências filtradas foram mapeadas com o genoma do camarão (ASM378908 v1) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10710>). O resultado da contagem da expressão gênica foi normalizado pelo RSEM para valores de TPM (transcritos por milhão). A análise de expressão diferencial foi realizada utilizando o software R/EBSeq com uma taxa de descoberta falsa (FDR) <0,05 e os resultados foram plotados em gráficos de barra convencionais.

IV.9. Análises de expressão gênica

IV.9.1. Análises semiquantitativas de distribuição da expressão gênica

As reações de RT-PCR (Transcrição Reversa seguida de PCR) para as análises de distribuição da expressão gênica foram realizadas no volume de 15 µL contendo 1 µL de cDNA, 2 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada iniciador (**Tab. 1**) e 1 U de Taq DNA polimerase

(Sinapse). As condições da PCR foram: 1 ciclo de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 57 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, e extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo. A expressão do gene actina (*LvActin*) foi utilizada como controle endógeno e as condições da PCR foram: 40 ciclos a 95 °C por 45s, 50 °C por 45 s e 72 °C por 1 min.

IV.9.2. Análises quantitativas de expressão gênica por RT-qPCR

As reações de RT-qPCR (Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real) foram realizadas utilizando-se o sistema StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em duplicata num volume final de 15 µL contendo 0,2 µM de cada iniciador (**Tab. 1**), 7,5 µL de Maxima Sybr Green/ROX Master Mix 2× (Thermo Scientific) e 1 µL de cDNA (diluído 1:10). As condições da RT-qPCR foram: 1 ciclo de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Ao término dos ciclos, foi realizada uma curva de dissociação (*melting curve*: 60 a 95 °C, sendo a transição de temperatura de 0.05 °C/s) para avaliar a especificidade dos iniciadores. A eficiência dos iniciadores (E) foi calculada de acordo com a equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$.

Nos experimentos de infecção experimental utilizando amostras de hemócitos, foram utilizados como genes de referência o fator de alongação eucariótico 1-alfa (*LvEF1α*) e as proteínas ribossomais *LvL40*, *LvRpS3A* e *LvRpS6*, sendo o grupo *naïve* utilizado como condição calibradora. As diferenças estatísticas foram analisadas com o teste ANOVA *one-way* com *post-hoc* de Tukey, considerando o $P < 0,05$ e o *fold-change* $> 1,5$. Nos experimentos de infecção experimental utilizando amostras de intestino médio, foram utilizados como genes de referência o *LvEF1α*, *LvL40* e *LvActin*, sendo o grupo *naïve* também utilizado como condição calibradora. As diferenças estatísticas foram analisadas de maneira idêntica ao mencionado anteriormente. Para a quantificação de transcritos nas três porções do intestino médio (anterior, médio e posterior) foram utilizados os genes de referência *LvEF1α*, *LvRpS3A*, *LvRpS6* e *LvActin*, sendo o grupo *naïve* também utilizado como condição calibradora. Para essa quantificação, a análise estatística utilizada foi o teste t de Student, considerando o $P < 0,05$ e o *fold-change* $> 1,5$.

Finalmente, para a quantificação da expressão gênica ao longo do desenvolvimento foram utilizados como genes de referência o *LvRpS6* e a *LvActin*, sendo amostras de hemócitos de camarões juvenis utilizadas como condição calibradora. Para isso, a análise

estatística utilizada foi o teste ANOVA *one-way* com *post-hoc* de Tukey, considerando o $P < 0,05$. Os genes foram considerados como não expressos em um específico estágio de desenvolvimento quando a amplificação por PCR não produziu algum produto (sem curvas de dissociação), enquanto as reações que mostraram valores de Cq maiores que o limite de quantificação (mas que geraram um perfil de curva de dissociação) foram considerados como não-quantificáveis.

IV.10. Quantificação absoluta dos genes *Lvan-STY1* e *Lvan-STY2*

As quantificações absolutas foram realizadas por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) a partir do gDNA extraído dos pleópodes de cinco indivíduos saudáveis. Para quantificação do número de cópias gênicas de *Lvan-STY1* e *Lvan-STY2* foram utilizados iniciadores específicos (**Tab. 1**) em reações contendo 80 ng de gDNA. O número de cópias foi calculado utilizando uma curva padrão derivada de uma série de diluições de $10\times$ de plasmídeos contendo os genes de interesse (10^7 a 10^3 plasmídeos/ μL ; $R^2=0,998$ e $0,999$ para *Lvan-STY1* e *Lvan-STY2*, respectivamente).

Todas as reações de qPCR foram realizadas em triplicatas (curvas de diluição) ou duplicatas (amostras) num volume final de 15 μL contendo 0,2 μM de cada iniciador (**Tab. 1**), 7,5 μL de Maxima Sybr Green/ROX Master Mix $2\times$ (Thermo Scientific) e 1 μL de gDNA. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) e os valores finais foram calculados no programa StepOne software v2.3.

IV.11. Quantificação absoluta dos transcritos

Após síntese do cDNA total (item IV.4), clonagem molecular no vetor pGEM-T-easy e purificação de cada plasmídeo (item IV.5), foram feitas quantificações absolutas dos transcritos por qPCR. Para isso, os plasmídeos foram quantificados por espectrofotometria (Nanovue) e, em seguida, foi calculado o número de moléculas/ μL seguindo o número de Avogadro. Cada plasmídeo contendo a sequência de interesse foi adicionado em placas de 96 poços (1 μL , cada poço), para se construir uma curva de diluição com valores agora conhecidos de moléculas/ μL , juntamente com amostras de cDNA (1 ng de RNA total) de animais do grupo naïve ($n=5$) para análises seguindo uma curva de diluição (10^9 a 10^1 plasmídeos/ μL).

Todas as reações de qPCR foram realizadas em triplicatas (curvas de diluição) ou duplicatas (amostras) num volume final de 15 μL contendo 0,2 μM de cada iniciador (**Tab. 1**), 7,5 μL de Maxima Sybr Green/ROX Master Mix $2\times$ (Thermo Scientific) e 1 μL de cDNA.

As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) e os valores finais foram calculados no programa StepOne software v2.3. As diferenças estatísticas foram analisadas com o teste ANOVA one-way com post-hoc de Tukey, considerando o $P < 0,05$.

IV.12. Imunohistoquímica

IV.12.1. Preparo dos tecidos

Camarões juvenis ($n = 3$) foram fixados por perfusão intramuscular com solução de Davidson (22% de formaldeído, 31,2% etanol absoluto e 11,5% de ácido acético glacial) e colocados em repouso por 24 h na mesma solução à temperatura ambiente. Posteriormente, amostras de cefalotórax foram coletadas, embebidas em parafina e cortadas em secções de 5 μm de espessura, seguindo instruções do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB, UFSC). Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados em séries de xilol-etanol-água e lavados em tampão TBS (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,2).

IV.12.2. Imunodeteção

Os cortes previamente preparados foram permeabilizados em tampão TBS com adição 0,1 % de Triton X-100 (TBS 1 \times) por 30 min e bloqueados em solução de bloqueio (TBS-T: TBS 1 \times , 1% de BSA, 0,05 % de Tween-20) por 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpos primários policlonais anti-r*Lsty*-Stylicin1 (2,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 4 °C por 16 h, previamente produzidos por Rolland et al. (2010). Após o período, foram feitas três lavagens em TBS-T e as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (1:1000) (Life Technologies) por 3 h à temperatura ambiente. Por fim, os cortes foram incubados em solução de 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2 (pH 9,3) contendo 0,175 mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP; Sigma), 0,375 mg/mL de nitro blue tetrazolium (NBT; Sigma) e 0,24 mg/mL de levamisole (bloqueador de fosfatases endógenas; Sigma) por 1 h à temperatura ambiente, no escuro. Nos controles negativos, os anticorpos primários foram substituídos por soro pré-imune de coelho ou solução de TBS-T.

IV.13. Imunofluorescência *in toto*

Os ensaios de imunofluorescência *in toto* foram conduzidos com amostras do intestino completo (anterior, médio e posterior) de três animais. Para isso, os intestinos foram dissecados, lavados em tampão Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4) e

imediatamente fixados em 4% de paraformaldeído. Após fixação, os intestinos foram completamente esvaziados, abertos longitudinalmente, lavados em tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,2) e bloqueados em solução de PBS-T (PBS 1×, 1% BSA, 0,1% de Triton X-100) por 3 h à temperatura ambiente. Após este período, os intestinos foram incubados com anticorpos primários policlonais anti-*rLsty*-Stylicin1 (2,3 µg/mL) por 16 h a 4 °C. Posteriormente, os intestinos foram lavados 3× com PBS-T por 20 min, e incubados com solução contendo 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados a FITC (fluorescein isothiocyanate; Thermo Scientific), na proporção 1:500. Nos controles negativos, o anticorpo primário anti-*rLsty*-Stylicin1 foi substituído por soro pré-imune. Os experimentos foram repetidos 3× e as lâminas foram observadas por microscopia confocal (Leica DMI6000 B) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (UFSC).

V. RESULTADOS

Os resultados desta tese foram organizados na forma de dois capítulos:

CAPÍTULO I: Artigo científico “*Litopenaeus vannamei* stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. *Fish and Shellfish Immunology* 86 (2019) 82-92”.

CAPÍTULO II: Análise gênica e transcricional dos peptídeos antimicrobianos do camarão *Litopenaeus vannamei*. Artigo científico em preparação.

RESULTADOS**CAPÍTULO 1**

Até o presente momento, foram identificadas quatro famílias de peptídeos antimicrobianos codificadas por genes em camarões peneídeos: peneidinas, fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs), crustinas e stylicinas. As stylicinas são peptídeos antimicrobianos aniônicos com atividade restrita contra fungos filamentosos, os quais foram caracterizados em apenas duas espécies camarões, *L. stylirostris* e *M. japonicus*. Este primeiro capítulo da tese foi dedicado à identificação e caracterização molecular e transcricional de stylicinas em *L. vannamei*, o camarão peneídeo mais cultivado mundialmente.



Contents lists available at ScienceDirect

Fish and Shellfish Immunology

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

Full length article

Litopenaeus vannamei stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections



Natanael Dantas Farias^{a,1}, Marcelo Falchetti^{a,1}, Gabriel Machado Matos^a, Paulina Schmitt^b, Cairé Barreto^a, Nicolas Argenta^a, Jean-Luc Rolland^c, Evelyne Bachère^c, Luciane Maria Perazzolo^a, Rafael Diego Rosa^{a,*}

Abstract

Stylicins are anionic antimicrobial host defense peptides (AAMPs) composed of a proline-rich N-terminal region and a C-terminal portion containing 13 conserved cysteine residues. Here, we have increased our knowledge about these unexplored crustacean AAMPs by the characterization of novel stylicin members in the most cultivated penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei*. We showed that the *L. vannamei* stylicin family is composed of two members (*Lvan*-Stylicin1 and *Lvan*-Stylicin2) encoded by different loci which vary in gene copy number. Unlike the other three gene-encoded antimicrobial peptide families from penaeid shrimp, the expression of *Lvan*-Stylicins is not restricted to hemocytes. Indeed, they are also produced by the columnar epithelial cells lining the midgut and its anterior caecum. Interestingly, *Lvan*-Stylicins are simultaneously transcribed at different transcriptional levels in a single shrimp and are differentially modulated in hemocytes after infections. While the expression of both genes showed to be responsive to damage-associated molecular patterns, only *Lvan*-Stylicin2 was induced after a *Vibrio* infection. Besides, *Lvan*-Stylicins also showed a distinct pattern of gene expression in the three portions of the midgut (anterior, middle and posterior) and during shrimp development. We provide here the first evidence of the diversity of the stylicin antimicrobial peptide family in terms of sequence and gene expression distribution and regulation.

Keywords: crustacean; penaeid shrimp; invertebrate immunity; antimicrobial peptide; host defense peptide; molecular diversity.

1. Introduction

Antimicrobial host defense peptides (AMPs) are important components of the innate immune system of both vertebrates and invertebrates. They are usually described as gene-encoded peptides (less than 10 kDa) with cationic and amphipathic properties which selectively target the negatively charged membranes of microbes [1]. In addition to those classical cationic antimicrobial peptides (also known as CAMPs), the current classification of AMPs also includes polypeptides/proteins larger than 10 kDa, AMPs generated by the processing of precursor molecules and anionic peptides [2]. Anionic antimicrobial peptides (AAMPs) comprise a non-phylogenetic group of either gene-encoded or non-ribosomally synthesized molecules with a high proportion of anionic amino acid residues (aspartate and glutamate). AAMPs are widely distributed in living organisms and play an important role in host defense against bacteria, fungi and viruses [3]. Like their cationic counterparts, AAMPs are multifunctional molecules engaged in different biological and immunological processes beyond antimicrobial functions [3].

Shrimp farming is an important economic activity for many developing countries in Asia and Latin America, which has been repeatedly threatened by infections caused by viruses and pathogenic bacteria from the genus *Vibrio*. Consequently, infectious diseases outbreaks are clearly a major concern in aquaculture that has encouraged extensive research efforts. The scientific findings in the last decade have provided valuable information on the role of AMPs in shrimp defenses. More than natural antibiotics, shrimp AMPs are also involved in the control of the natural microbiota, wound healing, bacterial clearance and other immunomodulatory functions [4]. To date, four gene-encoded AMP families have been identified in the hemocytes of penaeid shrimp: penaeidins, crustins, anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) and stylicins [4,5].

Stylicins were initially identified as transcripts associated to shrimp survival to pathogenic *Vibrio* infections [6]. The fully characterization of stylicins revealed that they are anionic peptides of 8.9 kDa composed of an N-terminal proline-rich region followed by a C-terminal region containing 13 cysteine residues [7]. In *Litopenaeus stylirostris* shrimp, stylicins form a diverse AAMP family composed of two members, named *Lsty*-Stylicin1 and *Lsty*-Stylicin2. Although the antimicrobial activity of the recombinant *rLsty*-Stylicin1 has been shown to be restricted to filamentous fungi, the *rLsty*-Stylicin1 displayed a strong lipopolysaccharide (LPS)-binding activity and the ability to agglutinate Gram-negative bacteria [7]. In the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*, the gene expression of its single stylicin (*Mjap*-Stylicin) showed to be modulated in gills and hepatopancreas in response to

the White spot syndrome virus (WSSV) [8]. Curiously, apart from these two reports [7,8], no other stylicin members have been characterized thus far.

In order to fill this research gap, novel members of the stylicin AMP family were identified and characterized in the most important cultured penaeid species, *Litopenaeus vannamei*. We showed that *L. vannamei* stylicins (*Lvan*-Stylicin1 and *Lvan*-Stylicin2) are highly anionic peptides encoded by two distinct genomic loci that follow different patterns of gene regulation during shrimp development and after microbial infections. Interestingly, while both genes responded to danger/damage-associated molecular patterns (shrimp muscle tissues), only *Lvan*-Stylicin2 showed to be up-regulated in circulating hemocytes in response to a *Vibrio* infection. Moreover, by combining immunohistochemistry and whole-mount immunofluorescence assays, we showed that *Lvan*-Stylicins are also constitutively produced by the midgut columnar epithelial cells. To our knowledge, this is the first evidence for the expression of a shrimp gene-encoded AMP in other tissues than the immune cells from the hemolymph.

2. Materials and Methods

A metodologia deste artigo encontra-se detalhada na seção IV da tese.

3. Results

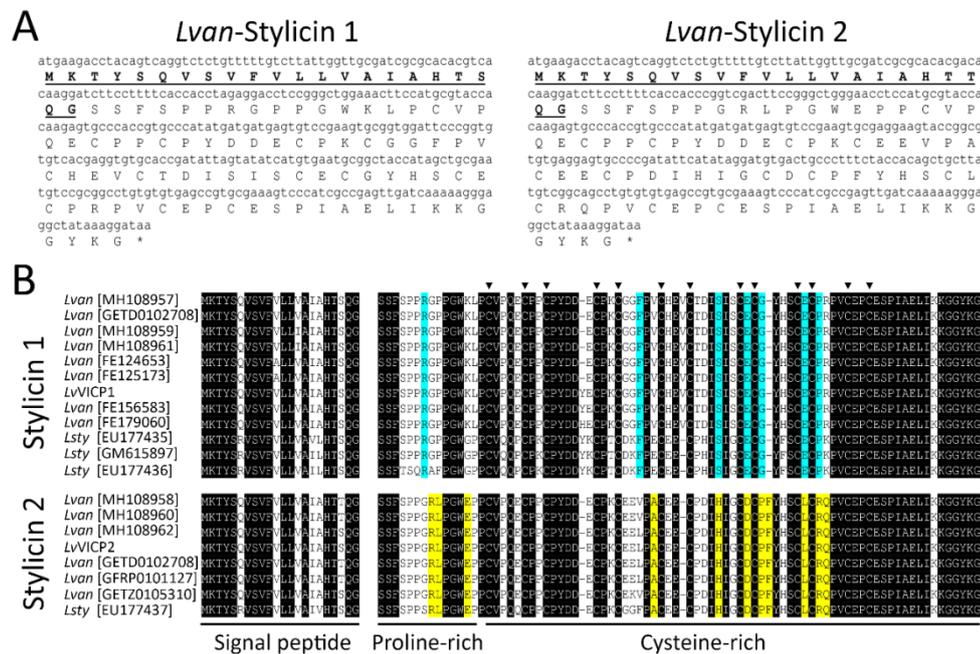
3.1. *L. vannamei* stylicins comprise a diverse AAMP family

The transcriptomic analysis of the *L. vannamei* midgut (unpublished) has revealed the presence of two nucleotide sequences (contigs: DN31608_c0_g1_i1 and DN31608_c0_g1_i2) homologous to the stylicin antimicrobial peptides from the blue shrimp *L. stylirostris* (*Lsty*-Stylicin1 and *Lsty*-Stylicin2). Both sequences correspond to full-length transcripts that encode for precursors composed of a signal peptide followed by a mature peptide containing 13 cysteine residues. The full-length stylicin sequences from *L. vannamei* were cloned by PCR amplification from gDNA samples and re-sequenced for confirmation. The nucleotide sequence corresponding to the contig DN31608_c0_g1_i2 shared 86% identity with *Lsty*-Stylicin1 (GenBank: EU177435) whereas the contig DN31608_c0_g1_i1 shared 93% identity with *Lsty*-Stylicin2 (GenBank: EU177437). Thus, those sequences from *L. vannamei* were designated as *Lvan*-Stylicin1 (GenBank: MH108957) and *Lvan*-Stylicin2 (GenBank: MH108958), respectively (**Fig. 1A**).

The deduced amino acid sequences of *Lvan*-Stylicins start with a predicted 22-residue signal peptide followed by an anionic mature peptide of 82 amino acid residues (**Fig. 1A**;

Table S1 – Apêndice 2). Although *Lvan*-Stylicins contain no obvious protein domains, both mature peptides are characterized by the presence of a proline-rich N-terminal region and a C-terminal region holding the 13 conserved cysteine residues found in *L. stylirostris* stylicins and in the *Mjap*-Stylicin from *M. japonicus*. *Lvan*-Stylicins were quite similar to each other and to stylicins from *L. stylirostris* (>80% identity), but less than 65% amino acid identity was observed between *Lvan*-Stylicins and *Mjap*-Stylicin.

In silico analysis of *L. vannamei* non-annotated databases publicly available on GenBank led to the identification of different isoforms for each *L. vannamei* stylicin: five for *Lvan*-Stylicin1 (GenBank: FE179060, FE156583, FE124653, FE125173 and GETD01027084) and three for *Lvan*-Stylicin2 (GenBank: GETD01027083, GETZ01053100 and GFRP01011277). Those sequences were identified in EST and TSA libraries from multiple shrimp tissues, such as hemocytes, lymphoid organ, nerve cord and hepatopancreas. Additionally, we included in this analysis the *Vibrio penaeicida*-induced cysteine and proline-rich peptides (*LvVICP1* and *LvVICP2*), stylicin homologues identified in *L. vannamei* by Wang and colleagues [15]. While *Lvan*-Stylicin2 sequences differed only by synonymous and non-synonymous substitutions, *Lvan*-Stylicin1 sequences showed two distinct lengths: 82 or 83 amino acid residues (**Fig. 1B**; Table S1 – Apêndice 2). Besides from the synonymous and non-synonymous substitutions, *Lvan*-Stylicin1 peptides can be distinguished from each other by the presence/absence of a tyrosine (Y) or histidine (H) residue at the position 51 of the precursor peptide (**Fig. 1B**). The 82-residue *Lvan*-Stylicin1 peptides showed a molecular weight of 8.83 kDa and a calculated pI of 4.98 while the 83-residue *Lvan*-Stylicin1 peptides showed a molecular weight ranging from 8.97 to 9.02 kDa and a calculated pI of 4.98 or 5.19 (Table S1 – Apêndice 2). Comparatively, the mature *Lvan*-Stylicin2 peptides had a molecular weight of about 9 kDa and a calculated pI ranging from 4.47 to 4.69 (Table S1 – Apêndice 2).

Figure 1 - Nucleotide and deduced amino acids sequence and alignments

(A) Nucleotide and deduced amino acid sequences (one letter code) of *Lvan-Stylicin1* (GenBank: MH108957) and *Lvan-Stylicin2* (GenBank: MH108958). The predicted signal peptides are in bold and underlined. Asterisks (*) mark the stop codon. (B) Amino acid sequence alignments of stylicins from penaeid shrimp species from the genus *Litopenaeus* (*Lvan*: *L. vannamei* and *Lsty*: *L. stylirostris*). Identical amino acid residues are highlighted in black while specific amino acid residues found in Stylicin1 and Stylicin2 peptides are highlighted in blue and yellow, respectively. Triangles (▼) indicate the 13 conserved cysteine residues. GenBank accession numbers are indicated in brackets. The sequences of the *Vibrio*

3.2. *L. vannamei* stylicins are encoded by distinct genomic loci

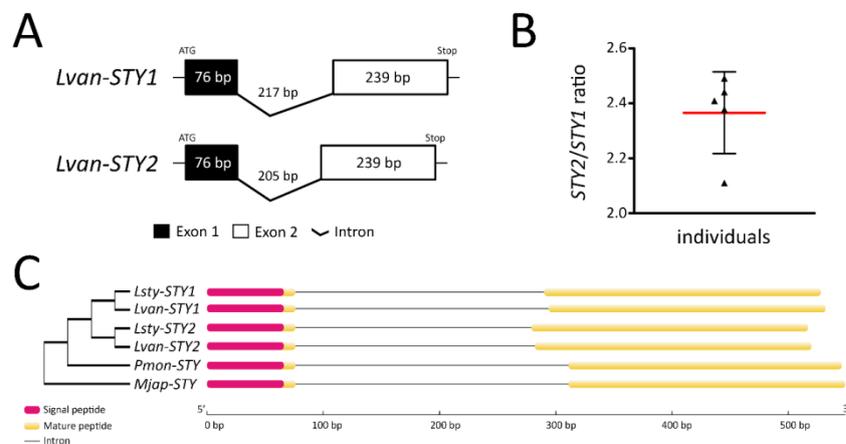
The genomic organization of *L. vannamei* stylicin genes (*Lvan-STY1* and *Lvan-STY2*) was investigated in two individual shrimp using PCR-based and cloning strategies. Sanger DNA sequencing results showed that *Lvan-Stylicins* are encoded by distinct genomic sequences, but share a similar structural gene organization (Fig. 2A). *Lvan-STY1* and *Lvan-STY2* genes are composed by two exons interrupted by a single intron with a length of 217 bp and 205 bp, respectively (Fig. 2A). Both genomic DNA sequences followed the canonical GT/AG splicing recognition rule at the exon/intron boundaries (Fig. S1 – Appendix 1). In both genes, the first exon covers the 5'-untranslated region (UTR), the signal peptide and the first three residues of the mature peptide while the second exon encodes the remainder of the mature peptide sequence and the 3'-UTR.

Interestingly, the *Lvan-STY1* genes from the two sampled shrimp were identical to each other while the nucleotide sequence of their *Lvan-STY2* genes differed in ten nucleotides:

one in the first exon, five in the intron and four in the second exon (**Fig. S1 – Apêndice 1**). The five nucleotide substitutions found in the coding sequence resulted in the change of two amino acid residues. The obtained genomic sequences were deposited in GenBank under the accession numbers MH108959 to MH108962.

Then, we asked whether *Lvan-STY1* and *Lvan-STY2* genes have the same number of copies in *L. vannamei* genome. The relative gene copy number ratio of *Lvan-STY2/Lvan-STY1* was estimated in five individual animals by quantitative PCR. The number of *Lvan-STY2* gene copies was 2.37 ± 0.15 -fold higher than the number of copies of the *Lvan-STY1* gene (**Fig. 2B**). Finally, a phylogenetic analysis showed that the *Lvan-STY* genes were placed in the same clade with the stylicin genes from *L. stylirostris* (*Lsty-STY1*: EU177436 and *Lsty-STY2*: EU177437) (**Fig. 2C**). In this clade, *Lvan-STY1* and *Lsty-STY1* clustered together in a single group distinct to the *STY2* genes (**Fig. 2C**). Stylicin genes from *P. monodon* (*Pmon-STY*: NIUS012084699) and *M. japonicus* (*Mjap-STY*: NIUR011088360) clustered in separate groups.

Figure 2 - Schematic representation of stylicin genes from *Litopenaeus vannamei*



(A) Not-to-scale schematic representation of stylicin genes from *Litopenaeus vannamei* (*Lvan-STY1* and *Lvan-STY2*). Boxes represent the exons and the line between boxes represents the intron. Numbers indicate the length of exons and introns in base pairs. (B) Estimation of the copy number of *Lvan-STY* genes in five individual shrimp. The absolute quantification was assessed by qPCR using a standard curve derived from 10-fold dilution series of plasmids containing each target gene. Results are presented as the ratio of the abundance of *Lvan-STY2* gene copies per ng of gDNA to that of *Lvan-STY1*. (C) Structural organization and phylogenetic relationship of *STY* genes from penaeid shrimp: *Litopenaeus vannamei* (*Lvan-STY1*: MH108959 and MH108961; *Lvan-STY2*: MH108960 and MH108962), *Litopenaeus stylirostris* (*Lsty-STY1*: EU177436; *Lsty-STY2*: EU177437), *Penaeus monodon* (*Pmon-STY*: NIUS012084699) and *Marsupenaeus japonicus* (*Mjap-STY*: NIUR011088360). The cladogram at the left of the figure indicates the phylogenetic relationship of *STY* genes. Pink and yellow boxes

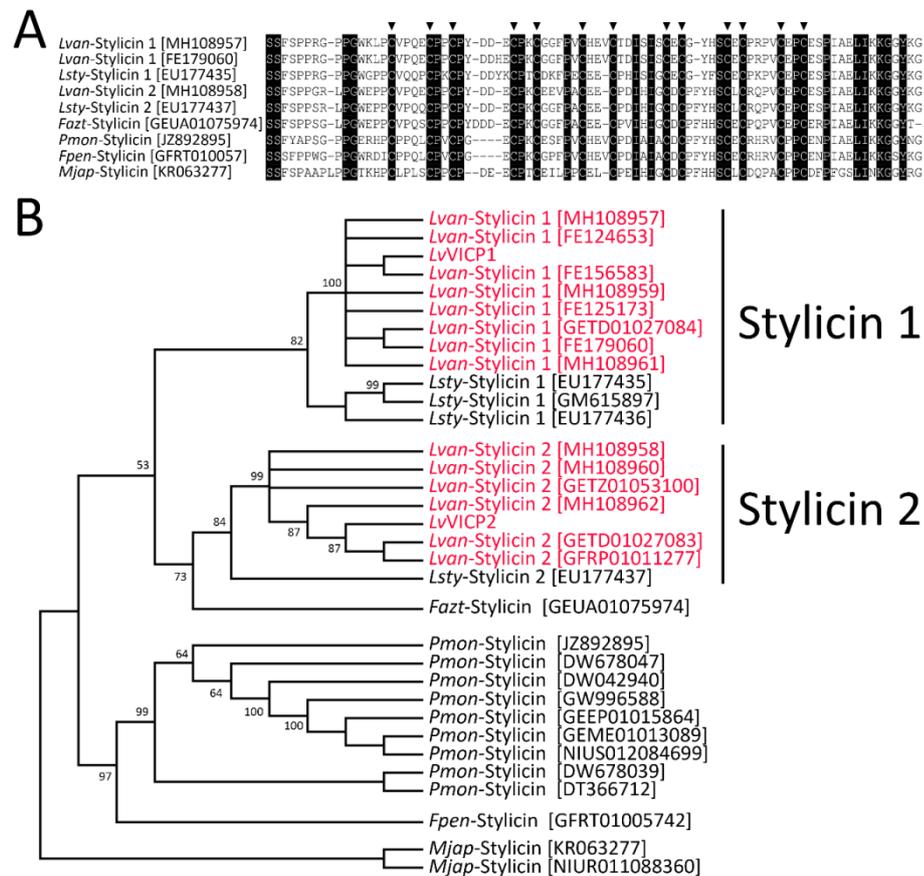
indicate the position of the signal peptides and the mature stylicins in the exons, respectively, while the black lines indicate the introns.

3.3. Stylicins cluster into three distinct phylogenetic groups

In silico mining of publicly accessible databases (EST, TSA and WGS) resulted in the identification of novel members of the Stylicin family in different penaeid species: *Fenneropenaeus penicillatus* (*Fpen*-Stylicin: GFRT01005742), *M. japonicus* (*Mjap*-Stylicin: NIUR011088360) and *P. monodon* (*Pmon*-Stylicin: JZ892895, DW678047, DW678039, DT366712, DW042940, GW996588, GEEP01015864, GEME01013089 and NIUS012084699). From our *in silico* analysis, stylicin sequences were only identified in penaeid shrimp species. All obtained sequences hold the 13 conserved cysteine residues at the C-terminal region (**Fig. 3A**).

Phylogenetic analysis revealed that the Stylicin family is a monophyletic group that evolved from a common ancestor gene. Phylogenetic trees constructed with nucleotide and predicted amino acid sequences shared similar topological structures. As shown in Fig. 3B, stylicins clustered in three main clades. The first clade included only stylicin sequences from penaeid species from the genus *Litopenaeus*. In this clade, Stylicin1 and Stylicin2 were split into two distinct groups (**Fig. 3B**). Finally, while *Pmon*-Stylicins and *Fpen*-Stylicin clustered in a second phylogenetic group, *Mjap*-Stylicins formed a separate clade from all stylicin sequences (**Fig. 3B**).

Figure 3 - Amino acid sequence alignments and phylogenetic analysis of stylicins



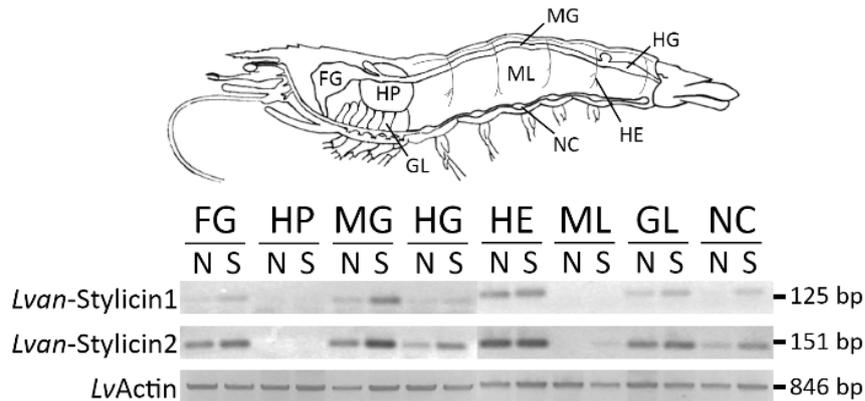
(A) Amino acid sequence alignments of mature peptides of stylicins. Identical amino acid residues are highlighted in black. Triangles (▼) indicate the 13 conserved cysteine residues. GenBank accession numbers are indicated in brackets. (B) Phylogenetic analysis of stylicins from penaeid shrimp. The tree was constructed using the Maximum Likelihood method with bootstrap values calculated from 1,000 trees. Sequences included in analyses were the following: *Litopenaeus vannamei* (*Lvan*-Stylicin1: MH108957, MH108959, MH108961, FE179060, FE156583, FE124653, FE125173, GETD01027084 and *LvVICP1*; *Lvan*-Stylicin2: MH108958, MH108960, MH108962, GETD01027083, GETZ01053100, GFRP01011277 and *LvVICP2*), *Litopenaeus stylirostris* (*Lsty*-Stylicin1: EU177435, EU177436 and GM615897; *Lsty*-Stylicin2: EU177437), *Fenneropenaeus penicillatus* (*Fpen*-Stylicin: GFRT01005742), *Penaeus monodon* (*Pmon*-Stylicin: JZ892895, DW678047, DW678039, DT366712, DW042940, GW996588, GEEP01015864, GEME01013089 and NIUS012084699) and *Marsupenaeus japonicus* (*Mjap*-Stylicin: KR063277 and NIUR011088360).

3.4. Stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells

The gene expression distribution of *L. vannamei* stylicins was first evaluated in eight different tissues of shrimp stimulated or not by the injection of heat-killed *V. harveyi*. Results from the semiquantitative RT-PCR analysis evidenced the presence of *Lvan*-Stylicin1 transcripts in circulating hemocytes, foregut, midgut and gills (Fig. 4). In *Vibrio*-stimulated animals, *Lvan*-Stylicin1 gene expression was also detected in hindgut and nerve cord.

Comparatively, transcripts of *Lvan*-Stylicin2 were detected in circulating hemocytes, foregut, midgut, hindgut, gills and nerve cord of both stimulated and non-stimulated animals (**Fig. 4**). For both *Lvan*-Stylicins, no signals were observed in muscle and hepatopancreas (**Fig. 4**).

Figure 4 - Gene expression distribution of *Litopenaeus vannamei* stylicins



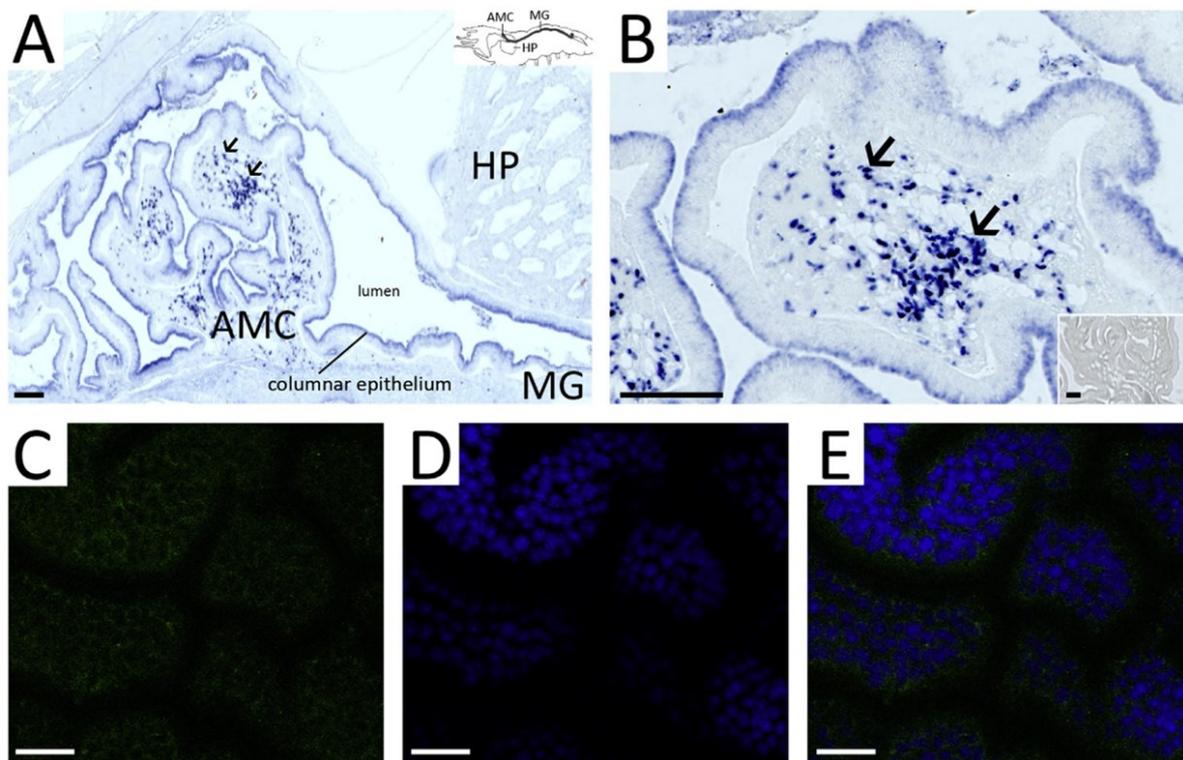
Gene expression distribution of *Litopenaeus vannamei* stylicins (*Lvan*-Stylicin1 and *Lvan*-Stylicin2) in different tissues from naïve (N) and *Vibrio*-stimulated (S) shrimp. Gene expression analysis was performed by semi-quantitative RT-PCR using the β -actin gene (*LvActin*) as an endogenous expression control. The figure (not-to-scale) shown at the top of the figure indicates the anatomic location of shrimp tissues: foregut (FG), hepatopancreas (HP), midgut (MG), hindgut (HG), circulating hemocytes (HE), muscle (ML), gills (GL) and nerve cord (NC).

To characterize the peptide localization of *Lvan*-Stylicins, immunohistochemistry analysis was subsequently performed on sections of different shrimp tissues using polyclonal antibodies raised against the *rLsty*-Stylicin1 from *L. stylirostris* [7]. Due to the high degree of sequence conservation, anti-*Lsty*-Stylicin1 antibodies probably recognized both *Lvan*-Stylicins. Stylicin immunoreactivity was found in individual cells heterogeneously distributed across the shrimp tissues. In the cephalothorax, positive immunoreactivity was especially pronounced in some cells present in the connective tissue of the anterior midgut caecum (**Fig. 5A-B**). Based on morphological features, those stylicin-positive cells are likely tissue-infiltrating hemocytes.

Besides those cells, stylicin immunoreactivity was also observed in the apical region of the columnar epithelial cells lining the midgut and its anterior caecum (**Fig. 5A-B**). Whole-mount immunofluorescence assays were further performed to confirm the presence of stylicin peptides in those epithelial cells. Confocal images clearly evidenced the presence of stylicin-containing granules located at the apical region of the midgut columnar epithelial cells (**Fig.**

5C-E). No signals were observed in other cell types of the shrimp body, thus the results of the semiquantitative RT-PCR analysis are probably the consequence of the infiltration of stylicin-expressing hemocytes in shrimp tissues. Altogether, results from both immunohistochemistry and whole-mount immunofluorescence assays showed that *Lvan*-Stylicins are constitutively produced by the hemocytes and by the columnar epithelial cells of the midgut.

Figure 5 - Immunodetection of *Lvan*-Stylicin peptides in shrimp tissues

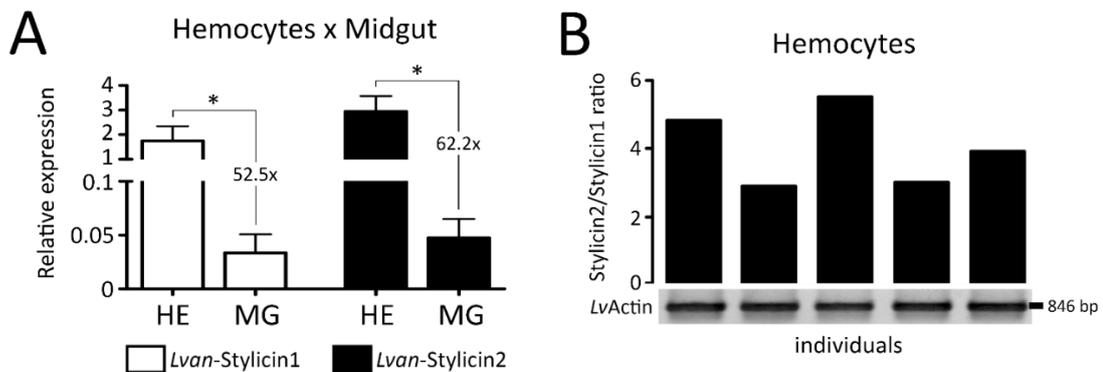


(A) Stylicin immune reactivity was observed in hemocytes infiltrating the connective tissue (arrows) and in the columnar epithelium of the midgut. The figure (not-to-scale) shown at the top panel indicates the anatomic location of shrimp tissues: anterior midgut caecum (AMC), midgut (MG) and hepatopancreas (HP). Scale bars = 100 μm . (B) A magnification of the anterior midgut caecum. The arrows indicate stylicin-expressing hemocytes infiltrating connective tissues. Negative controls consisted in replacing primary antibodies with pre-immune mouse serum (bottom panel). Scale bars = 100 μm . (C) Scanning confocal microscopy images of the immunodetection (whole mount immunofluorescence staining) of *Lvan*-Stylicin peptides present in granules located at the apical region of the midgut columnar epithelial cells. (D) Nuclei of the midgut columnar epithelial cells stained with DAPI. (E) Merged images of the stylicin-containing granules (green) and the nuclei (blue) of the midgut columnar epithelial cells. Scale bars = 20 μm .

3.5. *Lvan-STY1* and *Lvan-STY2* genes are simultaneously transcribed in a single shrimp at different basal levels

Since *Lvan*-Stylicins are produced by both hemocytes and midgut cells, we focused on determining the main site of stylicin expression in penaeid shrimp. Results showed that the expression of *Lvan*-Stylicin1 and *Lvan*-Stylicin2 was, respectively, 52.5-fold and 62.2-fold higher in circulating hemocytes than in the midgut (**Fig. 6A**). Next, the basal mRNA expression levels of the *Lvan-STY1* and *Lvan-STY2* genes were analyzed in the circulating hemocytes of five individual shrimp by absolute quantification. Interestingly, both *Lvan*-STY genes showed to be constitutively and simultaneously transcribed in an individual shrimp, but at different transcriptional levels. The basal expression of *Lvan-STY2* was 3.69-fold higher than *Lvan-STY1* (**Fig. 6B**). Besides, the basal mRNA levels of each gene showed to be also variable among the individuals (**Fig. 6B**). For the *Lvan-STY1* gene, differences in gene expression reached up to 3.78-fold whereas variations up to 2.36-fold were found in *Lvan-STY2* gene expression.

Figure 6 - Quantitative comparison of the relative abundance of *Lvan*-Stylicin1 and *Lvan*-Stylicin2

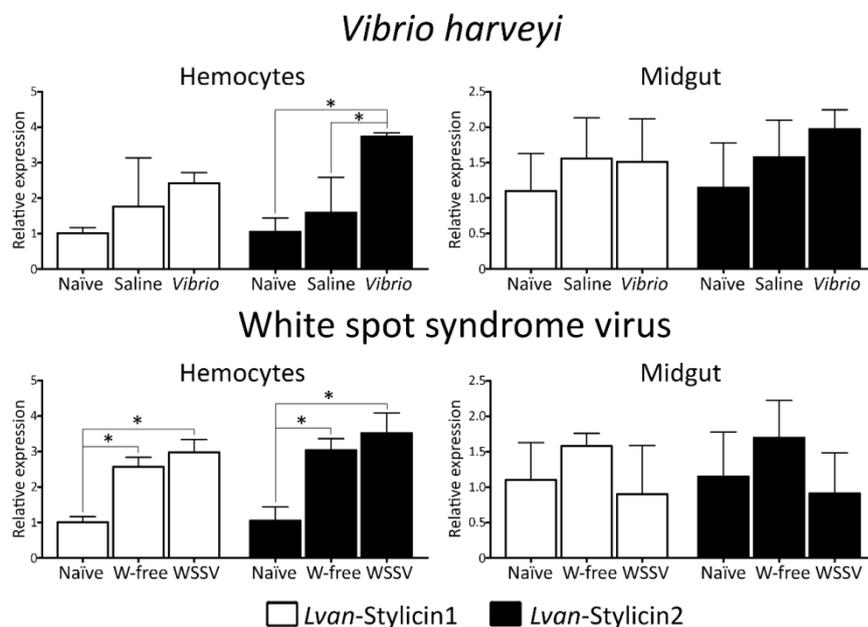


(A) Quantitative comparison of the relative abundance of *Lvan*-Stylicin1 (white bars) and *Lvan*-Stylicin2 (black bars) transcripts in circulating hemocytes (HE) and midgut (MG). Results are presented as mean \pm standard deviation of relative expressions (three biological replicates) and statistical differences are indicated by asterisks (*) (Student's t-test, $P < 0.05$). (B) Transcript abundance of *Lvan*-Stylicins in five individual shrimp. The absolute quantification was assessed by qPCR using a standard curve derived from 10-fold dilution series of plasmids containing each target gene. Results are presented as the ratio of the abundance of *Lvan*-Stylicin2 transcripts per ng of total RNA to that of *Lvan*-Stylicin1. The β -actin gene (*LvActin*) was used as endogenous expression control for each individual shrimp (lower panel).

3.6. The gene expression of *L. vannamei* stylicins is differentially modulated in response to infections

The gene expression profile of *Lvan*-Stylicins was further quantified by fluorescence-based quantitative PCR (RT-qPCR) in shrimp hemocytes and midgut at 48 h after infections with two unrelated pathogens, the Gram-negative *V. harveyi* and the WSSV. This time point was chosen on the basis of previous studies from our group [9,12]. Interestingly, while the expression of *Lvan*-Stylicin2 was induced in circulating hemocytes in response to the *Vibrio* infection (2.4-fold change), the expression of *Lvan*-Stylicin1 was not modulated (**Fig. 7**). No increase in *Lvan*-Stylicin2 expression was observed following the injection of sterile seawater (aseptic injury control). Besides, both genes were not modulated after the viral infection. In contrast, the expression of both genes was up-regulated in circulating hemocytes (2.5-fold change for *Lvan*-Stylicin1 and 2.9-fold change for *Lvan*-Stylicin2) after the injection of a muscle tissue homogenate prepared from WSSV-free shrimp (**Fig. 7**). In the midgut, the expression of *Lvan*-Stylicins was not regulated by the bacterial or by the viral infection (**Fig. 7**).

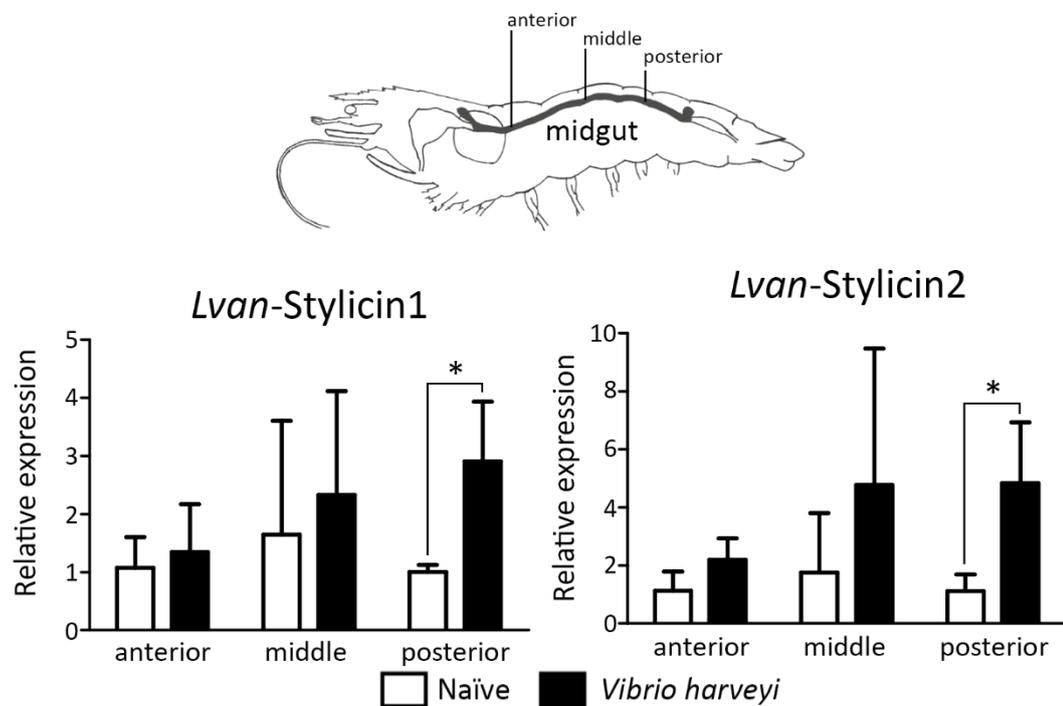
Figure 7 - Relative gene expression profile of *Lvan*-Stylicin1 and *Lvan*-Stylicin2



Relative gene expression profile of *Lvan*-Stylicin1 (white bars) and *Lvan*-Stylicin2 (black bars) in circulating hemocytes and midgut of shrimp at 48 h after experimental infections with the Gram-negative *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (6×10^7 CFU/animal) or the White spot syndrome virus (WSSV: 3×10^2 viral particles/animal). Results are presented as mean \pm standard deviation of relative expressions (three biological replicates) and statistical differences are indicated by asterisks (*) (one-way ANOVA/Tukey, $P < 0.05$). W-free: tissue homogenate inoculum prepared from WSSV-free shrimp.

The lack of gene expression response in the midgut encouraged us to conduct an alternative experimental infection method, mimicking a more natural route of bacterial infection (*per os* challenge). Variations in gene expression of *Lvan*-Stylicins were assessed by RT-qPCR in three midgut portions (anterior, middle and posterior). The expression of both *Lvan*-Stylicins was up-regulated (2.89-fold change for *Lvan*-Stylicin1 and 4.31-fold change for *Lvan*-Stylicin2) only in posterior portion of the midgut (Fig. 8). By contrast, no increase in *Lvan*-Stylicin gene expression was observed in the two first midgut portions (anterior and middle) in response to the oral *Vibrio* challenge (Fig. 8).

Figure 8 - Relative gene expression profile of *Lvan*-Stylicin1 and *Lvan*-Stylicin2 in shrimp midgut

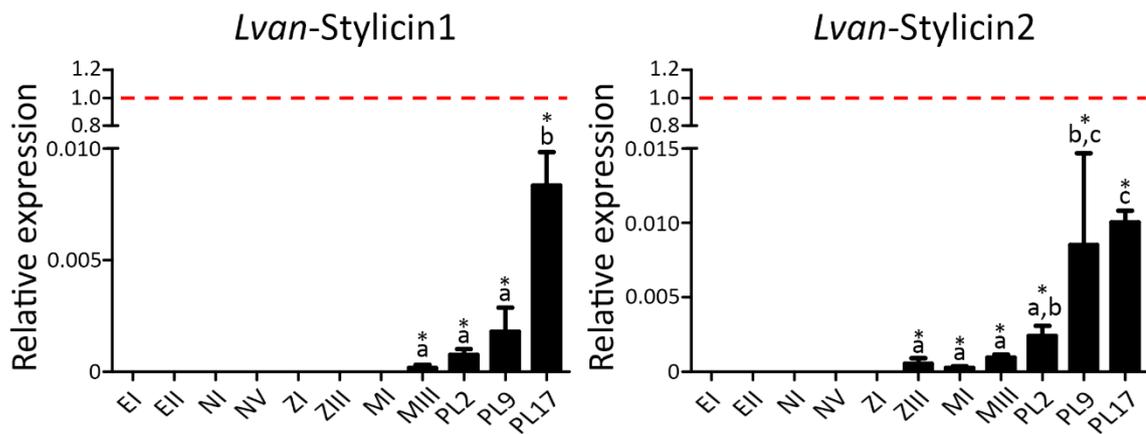


Relative gene expression profile of *Lvan*-Stylicin1 and *Lvan*-Stylicin2 in three portions of shrimp midgut (anterior, middle and posterior) at 21 h after the oral administration of 7.5×10^5 CFU/animal of live *V. harveyi* ATCC 14126. Results are presented as mean \pm standard deviation of relative expressions (three biological replicates) and statistical differences are indicated by asterisks (*) (Student's t-test, $P < 0.05$). The figure (not-to-scale) shown at the top of the figure indicates the anatomic location of the three midgut portions from naïve (white bars) and *Vibrio*-challenged (black bars) shrimp.

3.7. *L. vannamei* stylicins show a different pattern of gene expression during shrimp development

We finally investigated the presence and the levels of stylicin transcripts in eleven developmental stages of *L. vannamei*, from fertilized eggs to larval (nauplius, protozoa and mysis) and postlarval stages, and also in circulating hemocytes from juveniles. Transcript levels of *Lvan-Stylicin1* were detected at very low levels in late protozoa stages (ZIII), but its expression was only quantified from mysis III (MIII). Then, *Lvan-Stylicin1* expression increased gradually in the following developmental stages (**Fig. 9**). On the other hand, *Lvan-Stylicin2* transcripts were found to be present early in shrimp development (fertilized eggs at 7-11 h post-spawning). However, *Lvan-Stylicin2* expression was only quantified from the protozoa III (ZIII) stage (**Fig. 9**). For both genes, the highest mRNA abundance was quantified in hemocytes from juvenile shrimp (**Fig. 9**).

Figure 9 - Gene expression profile of *Litopenaeus vannamei* stylicins during shrimp development



EI: fertilized eggs at 0-4 h post-spawning; EII: fertilized eggs at 7-11 h post-spawning; NI: nauplius I; NV: nauplius V; ZI: protozoa I; ZIII: protozoa III; MI: mysis I; MIII: mysis III; PL2: postlarva 2; PL9: postlarva 9; PL17: postlarva 17. The red dotted line indicates the basal expression level in hemocytes from juvenile shrimp while the solid blue underline highlights the stages at which the gene expression was detected (valid dissociation curve profile) but not quantified (Cq values higher than the limit of quantification). Results are presented as mean \pm standard deviation (three biological replicates). Different letters indicate significant differences among the development stages while asterisks (*) shows significant differences between each developmental stage and hemocytes from juveniles (one-way ANOVA/Tukey, $P < 0.05$).

4. Discussion

We showed here that *L. vannamei* stylicins comprise a diverse family of anionic antimicrobial peptides (AAMPs) whose genes are differentially regulated in hemocytes and

midgut cells in response to infections. From the four gene-encoded AMPs described in penaeid shrimp, only stylicins have not been fully characterized in the Pacific white shrimp (*L. vannamei*) and this is the first study exploring the diversity of the stylicin family in terms of sequence and gene expression distribution and regulation. By taking advantage of RNA-Seq technology, we have identified two stylicin homologues (*Lvan-Stylicin1* and *Lvan-Stylicin2*) in midgut transcriptomes of *L. vannamei* showing high similarities to stylicins from the blue shrimp *L. stylirostris* [7]. From our *in silico* analysis, stylicins form a diverse gene family in shrimp species of the genus *Litopenaeus*, but not in other taxa of the family Penaeidae, such as *Fenneropenaeus*, *Penaeus* and *Marsupenaeus*. Essentially, our results revealed that all known *Litopenaeus* gene-encoded AMPs are present as diverse multigene families composed of different members. For instance, while *Litopenaeus* penaeidins are composed of three members (*Litvan* PEN1/2, *Litvan* PEN3 and *Litvan* PEN4), at least four members were identified in the crustin (Crustin *Lv*, Crustin-like *Lv*, *Lv*SWD and *Lv*SPLI) and in the ALF families (*Litvan* ALF-A to -D) [4,5]. However, unlike other gene-encoded AMPs from marine invertebrates, stylicins are exclusively composed of anionic peptides. Interestingly, the spectrum of activity of these anionic antimicrobials is restricted to filamentous fungi [7], even if their gene expression has shown to be associated to shrimp survival to pathogenic *Vibrio* infections [6]. Likewise, anionic peptides derived from the C-terminus of the shrimp respiratory protein hemocyanin are also specific against fungi [16]. These hemocyanin-derived peptides, named *Pv*HCT, are able to bind and permeabilize fungal membranes [17]. To date, the mechanism of action of stylicins and of other AAMPs is completely unknown. Actually, in comparison to CAMPs, few scientific groups have attempted to study the subject of AAMPs [3] and more functional studies are needed to achieve a more in-depth understanding of these unconventional AMPs.

We showed here that *Lvan-Stylicin1* and *Lvan-Stylicin2* are encoded by different genomic loci. Nonetheless, the presence of distinct stylicin genes was only observed in *Litopenaeus* species. Thus, it is likely that *STY1* and *STY2* are paralogous genes that arose from a single gene duplication event before the speciation of the genus *Litopenaeus*. Besides, although both *Lvan-STY* genes share a similar structural gene organization, their copy numbers in *L. vannamei* genome showed to be variable, suggesting that they have followed independent duplication events after *STY1-STY2* divergence. Apart from the two main stylicins members (*Lvan-Stylicin1* and *Lvan-Stylicin2*), we have identified *Lvan-Stylicin1* sequences with distinct lengths (82 and 83 amino acids in length). No evidences for the presence of alternative splicing were found in the *Lvan-STY1* gene, and thus it is most likely

that different alleles may occur for *L. vannamei* stylicin genes. Taken together, our results suggest that *L. vannamei* stylicins belong to a diverse multigenic and multiallelic family of AAMPs. Moreover, *Lvan-STY1* and *Lvan-STY2* genes showed to be simultaneously transcribed in a single shrimp. The different penaeidin and ALF members are also simultaneously expressed in an individual shrimp [18,19], and it would be of great interest to colocalize the four gene-encoded AMP families in shrimp hemocytes and examine whether they function synergistically to enhance their antimicrobial spectrum of activity. Synergic activities have already been observed for AMPs from both vertebrate [20] and invertebrate species [21,22], but unfortunately, no studies of this type have been addressed in crustaceans.

One of the most important findings of this study is that the expression of *Lvan-Stylicins* is not limited to the immune cells (hemocytes) as observed for the other three shrimp gene-encoded AMPs [4]. Both immunostaining and gene expression analysis revealed that *Lvan-Stylicins* are constitutively produced by the midgut columnar epithelial cells and that their expression is induced in response to *Vibrio* infections. Notably, the expression of *Lvan-Stylicin* was pronounced in the anterior midgut caecum, an intestinal region primarily involved in the production, secretion and activation of digestive enzymes [23]. Thus, it is plausible to hypothesize that *Lvan-Stylicins* are secreted into the midgut lumen. This finding brings new insights into the role of crustacean AMPs in the control of the gut microbiota and in shrimp intestinal defenses. Indeed, the shrimp midgut lacks the cuticular lining found in the other portions of the intestine (foregut and hindgut), representing a potential route of entry for many pathogens into the hemocoel. In a previous study, we showed that gut is an important source for the expression of immune-related genes in penaeid shrimp [12], thus the presence of stylicins in the midgut cells suggests the participation of these antimicrobial effectors in the first intestinal line of defense. Interestingly, the expression of some ALF members showed to be involved in the maintenance of the microbiota residing in the shrimp hemolymph [24]. Taken all together, our results highlight the importance of stylicins in both hemolymph-based and gut-based immunities.

Another relevant conclusion that can be drawn from this study is that *Lvan-STY* genes are differentially regulated after infections. Such diversity in gene expression regulation was previously reported for the different members of the *L. vannamei* ALF family in response to fungal infections [19]. Interestingly, while some AMPs such as *Lvan-Stylicin1*, penaeidins [25], *Litvan* ALF-A [19] and Type II crustins [26] are not-regulated in response to infections, the expression of other *L. vannamei* AMPs (*Lvan-Stylicin2* and other ALF members) is induced in immune cells to improve host antimicrobial responses against pathogens. On the

other hand, the expression of almost all shrimp AMPs, including *Lvan*-Stylicins, can be drastically affected in circulating hemocytes during lethal infections [9]. Unlike the *Mjap*-Stylicin from the kuruma prawn *M. japonicus* [8], *Lvan*-Stylicins were not modulated neither in circulating hemocytes nor in midgut by the WSSV. This result could be probably due to the time course response of *Lvan*-Stylicins in those shrimp tissues. On the other hand, both *Lvan*-*STY* genes have been shown to be responsive to a tissue homogenate prepared from shrimp muscle (injury control for the WSSV infection). This finding strongly suggests that *Lvan*-Stylicins are induced in response to danger/damage-associated molecular patterns (DAMPs) and that these AAMPs could be involved in early inflammation and in wound healing processes as proposed for penaeidins [25].

L. vannamei stylicin genes showed to be differentially regulated not only in response to infections, but also during shrimp development. Interestingly, *Lvan*-Stylicin2 and the *M. japonicus* stylicin showed a very similar pattern of gene expression during shrimp development [8]. Comparatively, *Lvan*-Stylicin1 expression was quite similar to that observed for other *L. vannamei* AMPs, such as *Litvan* PEN1/2, *Litvan* PEN4 and *Litvan* ALF-D [14]. Apart from that, we cannot discard the possibility of these changes in gene expression could be the result of the differences in the mRNA basal levels observed between the *Lvan*-*STY* genes. Indeed, the detection of stylicin transcripts, as well as of other gene-encoded AMPs, highlights the importance of these antimicrobial effectors during shrimp development.

5. Conclusions

In conclusion, we showed that the stylicin family from shrimp species of the genus *Litopenaeus* is composed of two members encoded by distinct genomic loci that exhibit different patterns of gene expression distribution and regulation. According to the best of our knowledge, this is the first evidence for the expression of a shrimp gene-encoded AMP in other tissues than the hemocytes. Even though the expression of stylicins has been shown to be a marker of shrimp survival to pathogenic *Vibrio* infections, the role of these effectors in shrimp immune defense is still largely unknown. The application of RNAi-based methods could make significant contributions to understanding the significance of the molecular and transcriptional diversity of *Litopenaeus* stylicins in host-microbe interactions.

Acknowledgments

We are grateful to the Laboratory of Marine Shrimp (Federal University of Santa Catarina - UFSC) for providing the shrimp used in this study and to Fabio S Ribeiro for his technical

assistance in the whole-mount immunofluorescence experiments. The authors are also thankful to the Electronic Microscopy Central Laboratory (LCME-UFSC) and the Multiuser Laboratory of Biology Studies (LAMEB-UFSC). This work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq (MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs PVE 401191/2014-1 and MCTI/CNPq Universal 406530/2016-5) and CAPES (CIMAR 1974/2014). P Schmitt was funded by FONDECYT grant 11150009. ND Farias and GM Matos were supported by scholarships provided by FAPESC while N Argenta received a scholarship provided by CNPq. M Falchetti and C Barreto were supported by fellowships provided by CAPES.

References

- [1] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238–50. doi:10.1038/nrmicro1098.
- [2] Yount NY, Bayer AS, Xiong YQ, Yeaman MR. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers* 2006;84:435–58. doi:10.1002/bip.20543.
- [3] Harris F, Dennison S, Phoenix D. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci* 2009;10:585–606. doi:10.2174/138920309789630589.
- [4] Destoumieux-Garzón D, Rosa RD, Schmitt P, Barreto C, Vidal-Dupirol J, Mitta G, et al. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2016;371:20150300. doi:10.1098/rstb.2015.0300.
- [5] Rosa RD, Barracco MA. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebr Surviv J* 2010;7:262–84.
- [6] de Lorgeril J, Saulnier D, Janech MG, Gueguen Y, Bachère E. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiol Genomics* 2005;21:174–83. doi:10.1152/physiolgenomics.00281.2004.
- [7] Rolland JL, Abdelouahab M, Dupont J, Lefevre F, Bachère E, Romestand B. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Mol Immunol* 2010;47:1269–77. doi:10.1016/j.molimm.2009.12.007.
- [8] Liu H, Wang J, Mao Y, Liu M, Niu S, Qiao Y, et al. Identification and expression analysis of a novel stylicin antimicrobial peptide from Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Fish Shellfish Immunology* 2015;47:817–23. doi:10.1016/j.fsi.2015.09.044.

- [9] Goncalves P, Guertler C, Bachère E, de Souza CRB, Rosa RD, Perazzolo LM. Molecular signatures at imminent death: hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. *Dev Comp Immunol* 2014;42:294–301. doi:10.1016/j.dci.2013.09.017.
- [10] Pilotto M, Goncalves A, Vieira F, Seifert W, Bachère E, Rosa R, et al. Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms* 2018;6:83. doi:10.3390/microorganisms6030083.
- [11] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547–9. doi:10.1093/molbev/msy096.
- [12] Silveira AS, Matos GM, Falchetti M, Ribeiro FS, Bressan A, Bachère E, 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. *Dev Comp Immunol* 2018;79:44–50. doi:10.1016/j.dci.2017.10.005.
- [13] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 2001;25:402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [14] Quispe RL, Justino EB, Vieira FN, Jaramillo ML, Rosa RD, Perazzolo LM. Transcriptional profiling of immune-related genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ontogenesis. *Fish Shellfish Immunol* 2016;58:103–7. doi:10.1016/j.fsi.2016.09.024.
- [15] Wang PH, Wan DH, Gu ZH, Qiu W, Chen YG, Weng SP, et al. Analysis of expression, cellular localization, and function of three inhibitors of apoptosis (IAPs) from *Litopenaeus vannamei* during WSSV infection and in regulation of antimicrobial peptide genes (AMPs). *PLoS One* 2013;8:e72592. doi:10.1371/journal.pone.0072592.
- [16] Destoumieux-Garzón D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachère E. Crustacean Immunity. *J Biol Chem* 2001;276:47070–7. doi:10.1074/jbc.M103817200.
- [17] Petit VW, Rolland JL, Blond A, Cazevielle C, Djediat C, Peduzzi J, et al. A hemocyanin-derived antimicrobial peptide from the penaeid shrimp adopts an alpha-helical structure that specifically permeabilizes fungal membranes. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860:557–68. doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.010.

- [18] Cuthbertson BJ, Shepard EF, Chapman RW, Gross PS. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics* 2002;54:442–5. doi:10.1007/s00251-002-0487-z.
- [19] Rosa RD, Vergnes AA, de Lorgeril J, Goncalves P, Perazzolo LM, Sauné L, et al. Functional divergence in shrimp anti-lipopolysaccharide factors (ALFs): from recognition of cell wall components to antimicrobial activity. *PLoS One* 2013;8:e67937. doi:10.1371/journal.pone.0067937.
- [20] Yan H, Hancock REW. Synergistic Interactions between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1558–60. doi:10.1128/AAC.45.5.1558-1560.2001.
- [21] Schmitt P, de Lorgeril J, Gueguen Y, Destoumieux-Garzón D, Bachère E. Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 2012;37:363–70. doi:10.1016/j.dci.2012.01.004.
- [22] Marxer M, Vollenweider V, Schmid-Hempel P. Insect antimicrobial peptides act synergistically to inhibit a trypanosome parasite. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2016;371:20150302. doi:10.1098/rstb.2015.0302.
- [23] McGaw IJ, Curtis DL. A review of gastric processing in decapod crustaceans. *J Comp Physiol* 2013;183:443–65. doi:10.1007/s00360-012-0730-3.
- [24] Wang XW, Xu JD, Zhao XF, Vasta GR, Wang JX. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 2014;289:11779–90. doi:10.1074/jbc.M114.552307.
- [25] Destoumieux D, Muñoz M, Cosseau C, Rodriguez J, Bulet P, Comps M, et al. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci* 2000;113:461–9. doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.010.
- [26] Barreto C, Coelho JR, Yuan J, Xiang J, Perazzolo LM, Rosa RD. Specific Molecular Signatures for Type II Crustins in Penaeid Shrimp Uncovered by the Identification of Crustin-Like Antimicrobial Peptides in *Litopenaeus vannamei*. *Mar Drugs* 2018;16:31. doi:10.3390/md16010031.

RESULTADOS**CAPÍTULO 2**

Após a identificação e caracterização das stylicinas descritas no Capítulo 1, este segundo capítulo teve como objetivo quantificar e comparar os níveis de expressão basal dos diferentes membros das quatro famílias de AMPs de camarões nos hemócitos de *L. vannamei*. A organização gênica, número de cópias e localização cromossômica de genes codificantes dos diferentes membros de AMPs serão aqui apresentados e discutidos. Finalmente, serão apresentadas as análises *in silico* de bibliotecas transcritômicas publicamente disponíveis para a determinação dos tipos hemocitários envolvidos na produção dos diferentes AMPs.

1. Introdução

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *Antimicrobial Peptides*) são importantes componentes no sistema imune de invertebrados. Eles são classicamente descritos como moléculas catiônicas, anfipáticas e com massa molecular inferior a 10 kDa (SMITH; DESBOIS; DYRYNDA, 2010). Em camarões peneídeos, os AMPs estão divididos em quatro famílias multigênicas compostas por diferentes membros: as peneidinas (subfamília I: PEN1/2, PEN3, PEN4 e PEN5; subfamília II: *MjPen-II*; BigPEN), os fatores anti-lipopossacarídeos (Grupos ALF-A a ALF-G), as crustinas (Tipos I a IV) e as stylicinas (STY1 e STY2) (MATOS; ROSA, 2021).

As peneidinas são peptídeos catiônicos, compostos por uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e arginina e uma região C-terminal rica em resíduos de cisteína (DESTOUMIEUX et al., 1997). Na espécie *Litopenaeus vannamei*, foram descritos os membros PEN1/2, PEN3 (DESTOUMIEUX et al., 1997) e PEN4 (CUTHBERTSON et al., 2002). Os diferentes membros da família dos ALFs (Grupos ALF-A a -G), por sua vez, estão amplamente distribuídos entre as espécies de camarões, os quais são classificados de acordo com suas características bioquímicas. Enquanto os ALFs dos Grupos A, D, E e G possuem natureza aniônica, os ALFs dos Grupos B, C e F possuem natureza catiônica. Os ALFs possuem dois resíduos de cisteínas característicos e bem conservados em todos os membros. Esses resíduos são responsáveis por realizar uma ligação dissulfeto, criando uma estrutura em forma grampo responsável pela atividade biológica dessas moléculas (MATOS et al., 2018).

As crustinas são classicamente descritas como (poli)peptídeos catiônicos ricos em resíduos de cisteína e que possuem na extremidade C-terminal um domínio WAP (do inglês, *Whey Acidic Protein*) (BARRETO et al., 2018; DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016; SMITH et al., 2008). Dos quatro grupos conhecidos (Tipos I a IV), as crustinas do Tipo II são as mais abundantes em camarões peneídeos, as quais são subdivididas em subTipos IIa (Crustin) e IIb (Crustin-like) (BARRETO et al., 2018). Finalmente, as stylicinas são peptídeos exclusivamente aniônicos contendo uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e uma região C-terminal com 13 resíduos conservados de cisteína (FARIAS et al., 2019; ROLLAND et al., 2010). Nos gêneros *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus*, as stylicinas estão divididas em dois grupos: STY1 e STY2 (FARIAS et al., 2019; MACHADO et al., 2021; ROLLAND et al., 2010).

A estrutura gênica dos AMPs permaneceu pouco explorada por muito tempo devido à ausência de genomas de referência em camarões. Apenas muito recentemente foram disponibilizados os genomas das espécies *L. vannamei* (ZHANG et al., 2019) e *Penaeus*

monodon (UENGWETWANIT et al., 2021). Em *L. vannamei*, as peneidinas foram descritas por O’Leary & Gross (2006) e inclui, além da organização dos genes *PEN1/2*, *PEN3* e *PEN4*, a presença de elementos de regulação transcricional, como *dorsal*, *GATA*, *STAT* e *AP-1* (O’LEARY; GROSS, 2006). Ambos os genes das stylicinas (*Lvan-STY1* e *Lvan-STY2*) foram descritos no capítulo 1 desta tese (FARIAS et al., 2019), enquanto que, em relação aos ALFs, a única descrição é do gene *ALF-F* (LIU et al., 2014). Os genes das crustinas dos Tipos IIa e IIb (Crustin *Lv* e Crustin-like *Lv*, respectivamente) foram descritos por Barreto et al. (2018). No entanto, informações importantes como a posição gênica (mapeamento cromossômico), número de cópias e organização gênica dos AMPs de *L. vannamei* ainda são desconhecidas.

Assim, o objetivo deste segundo capítulo foi explorar os aspectos genômicos e transcricionais dos diferentes membros das quatro famílias de AMPs do camarão *L. vannamei*. A partir da análise do genoma recém-publicado de *L. vannamei* (ZHANG et al., 2019), foram definidos (i) a organização estrutural dos genes (quantidade de éxons, íntrons e a orientação da transcrição), (ii) o número de cópias e (iii) o mapeamento cromossômico dos diferentes genes. Além dessa caracterização genômica, os níveis transcricionais de cada AMP foram quantificados e comparados nos hemócitos de animais juvenis. Finalmente, por meio de análises *in silico* do transcrito, foi possível identificar as populações hemocitárias que expressam cada uma das famílias de AMPs.

2. Material e Métodos

A metodologia deste capítulo encontra-se detalhada na seção IV da tese.

3. Resultados e Discussão

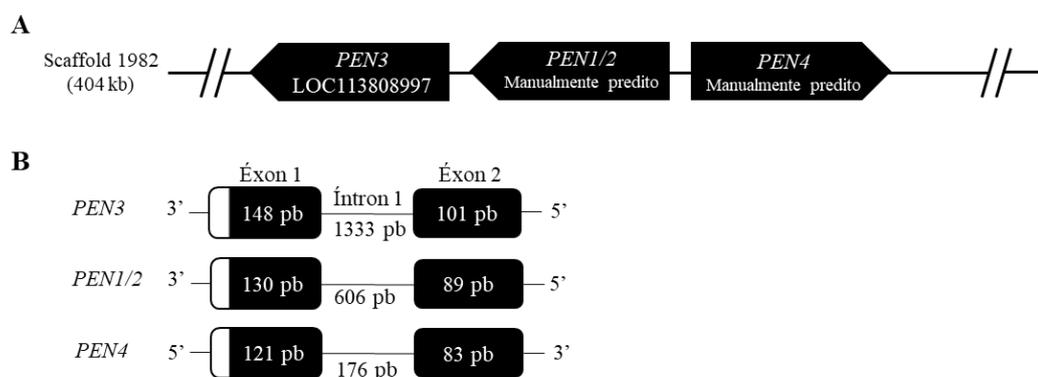
3.1. Mapeamento e organização estrutural dos genes codificantes de AMPs do camarão *L. vannamei*

O genoma de *L. vannamei* foi recentemente publicado e apresenta um tamanho total de 1,66 Gb distribuídos em 4.683 *scaffolds* (ZHANG et al., 2019). Diferentemente do genoma recém publicado do peneídeo *P. monodon* (UENGWETWANIT et al., 2021), o genoma de *L. vannamei* não se encontra mapeado nos 44 cromossomos que essa espécie possui. Assim, para este trabalho, o mapeamento gênico dos 14 AMPs de *L. vannamei* (peneidinas: *Litvan* *PEN1/2* a -4; ALFs: *Litvan* ALF-A a -G; crustinas do Tipo II: Tipo IIa Crustin *Lv* e Tipo IIb Crustin-like *Lv*; stylicinas: *Lvan*-Stylicin1 e *Lvan*-Stylicin2) foi realizado considerando os *scaffolds* disponíveis no GenBank. Vale a pena ressaltar que, para este trabalho, foram consideradas somente as crustinas dos subTipos IIa (Crustin *Lv*) e IIb (Crustin-like *Lv*) por

serem os membros mais bem descritos em *L. vannamei* e os mais expressos em camarões peneídeos quando comparados aos Tipos I, III e IV (SMITH et al., 2008; TASSANAKAJON et al., 2010). De maneira interessante, todos os genes codificantes dos membros da família das peneídeos mostraram-se presentes no mesmo *scaffold* (n° 1982), similar ao encontrado para os membros da família das stylicinas (*scaffold* n° 915). Por outro lado, os membros das famílias ALFs e crustinas apresentaram-se distribuídos em diferentes *scaffolds*. No entanto, é importante salientar que *scaffolds* distintos podem compor um mesmo cromossomo.

Apenas uma única cópia gênica de cada uma das três peneídeos de *L. vannamei* está presente no *scaffold* n° 1982 (404 kb). Todas as organizações gênicas dos AMPs desta tese estão descritas apenas em relação à região codificadora (do inglês, *Coding Sequence*, CDS) da molécula precursora (peptídeo sinal e peptídeo maduro). Alguns genes possuem um ou mais éxons que codificam as regiões 5' e 3' não traduzidas (5'-UTR ou 3'-UTR) e essas não foram incluídas nas análises. Enquanto os genes *PEN1/2* e *PEN3* estão localizados no frame negativo, o gene *PEN4* está localizado no frame positivo. Todos os três genes são compostos por dois éxons separados por um íntron de tamanho variado (**Fig. 1**).

Figura 1. Localização e organização dos genes codificantes das peneídeos



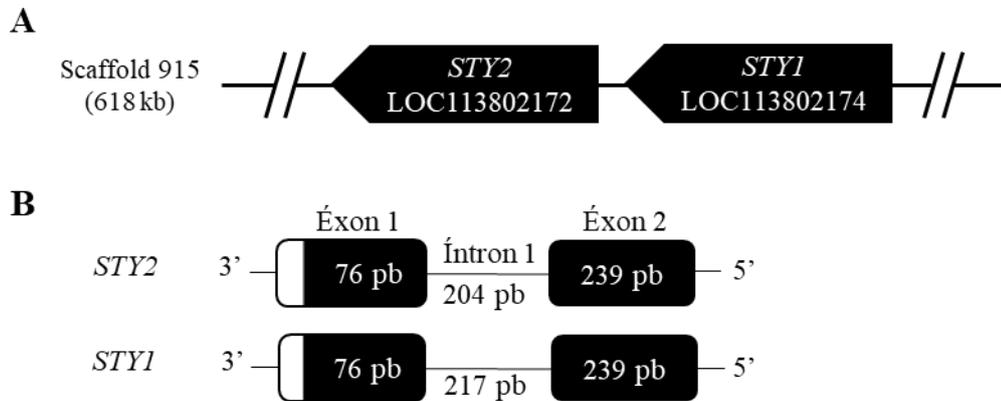
(A) Mapeamento dos genes *PEN* (*PEN1/2*, *PEN3* e *PEN4*). Os genes localizam-se no mesmo *scaffold* (n° 1982 com 404 kb) e possuem diferentes orientações. (B) Organização dos genes *PEN*. Todos os genes *PEN* encontrados são codificados por dois éxons (caixas pretas), de tamanho similar, separados por um íntron (linha) de tamanho variado. O peptídeo sinal dessa família (caixa branca) encontra-se codificado no éxon 1.

É importante notar que alguns erros nas sequências depositadas no GenBank também foram encontrados. Na análise do gene *PEN1/2* (predito manualmente), foi identificada a ausência de dois nucleotídeos no primeiro éxon, correspondentes a uma citosina seguida de uma adenina, respectivamente. Esses dois nucleotídeos foram então colocados manualmente na penúltima trinca 5'-...GCG TAC AGG GGC GGT TAC **AGG** CCC...-3', tornando-se 5'-...GCG TAC AGG GGC GGT TAC **ACA** GGC CC...-3'. De maneira semelhante, o gene *PEN3* (LOC113808997) também possui erro de remoção de um nucleotídeo, nesse caso, uma citosina. Baseado na sequência predita do mRNA, uma citosina foi adicionada manualmente na última trinca (5'-... GTG TAC AAG GGC GGT TAC ACG CGC **CCG** A...-3). No caso do gene *PEN4* (predito manualmente), não foram necessárias alterações. Sendo assim, na família das peneidinas, o primeiro éxon dos três membros codifica o peptídeo sinal e a porção N-terminal do peptídeo maduro contendo o domínio rico em resíduos de prolina e arginina. O segundo éxon codifica o domínio rico em cisteínas, o que equivale à região C-terminal. Diferentemente do encontrado no genoma, o gene *PEN3* caracterizado por O'Leary & Gross (2006) não apresentou íntron. Isso pode decorrer da existência de alelos distintos em diferentes camarões, principalmente por esses animais possuírem um alto índice de polimorfismo gênico e alélico, como também observado pelos autores.

A família das stylicinas possui um mapeamento semelhante ao das peneidinas. Os genes *Lvan-STY1* e *Lvan-STY2* foram encontrados no mesmo *scaffold* (n° 915), que possui 618 kb, sendo que cada gene possui uma única cópia gênica (**Fig. 2**). Esse resultado foi contrastante ao descrito no Capítulo 1, onde o gene *Lvan-STY2* (LOC113802172) possui pelo menos o dobro de cópias em relação ao gene *Lvan-STY1* (LOC113802174) (FARIAS et al., 2019). Contudo, o sequenciamento do genoma de *L. vannamei* (ZHANG et al., 2019) foi realizado em um único indivíduo proveniente da China e os resultados de Farias et al. (2019) foram referentes a cinco indivíduos provenientes do Brasil. Além disso, no sequenciamento podem existir alguns erros de montagem ou sequenciamento de alguma parte do genoma, como o descrito adiante para o gene *ALF-F*. É importante citar também que Zhang et al. (2019) identificaram que um único exemplar de *L. vannamei* possui um alto índice de genes recém-duplicados (4.662 genes). Sabe-se ainda que dentro da mesma espécie é possível existir um alto polimorfismo gênico, que inclui polimorfismos de nucleotídeos simples (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs) e alélicos (CUTHBERTSON et al., 2002; O'LEARY; GROSS, 2006). Por fim, os dois genes das stylicinas encontrados no genoma estão localizados no *frame* negativo e ambos os peptídeos são codificados por dois éxons de

tamanho igual separados por um íntron (**Fig. 2**). O primeiro éxon codifica o peptídeo sinal, seguido do início do peptídeo maduro, o qual é codificado quase inteiramente pelo éxon 2.

Figura 2. Localização e organização dos genes codificantes das stylicinas



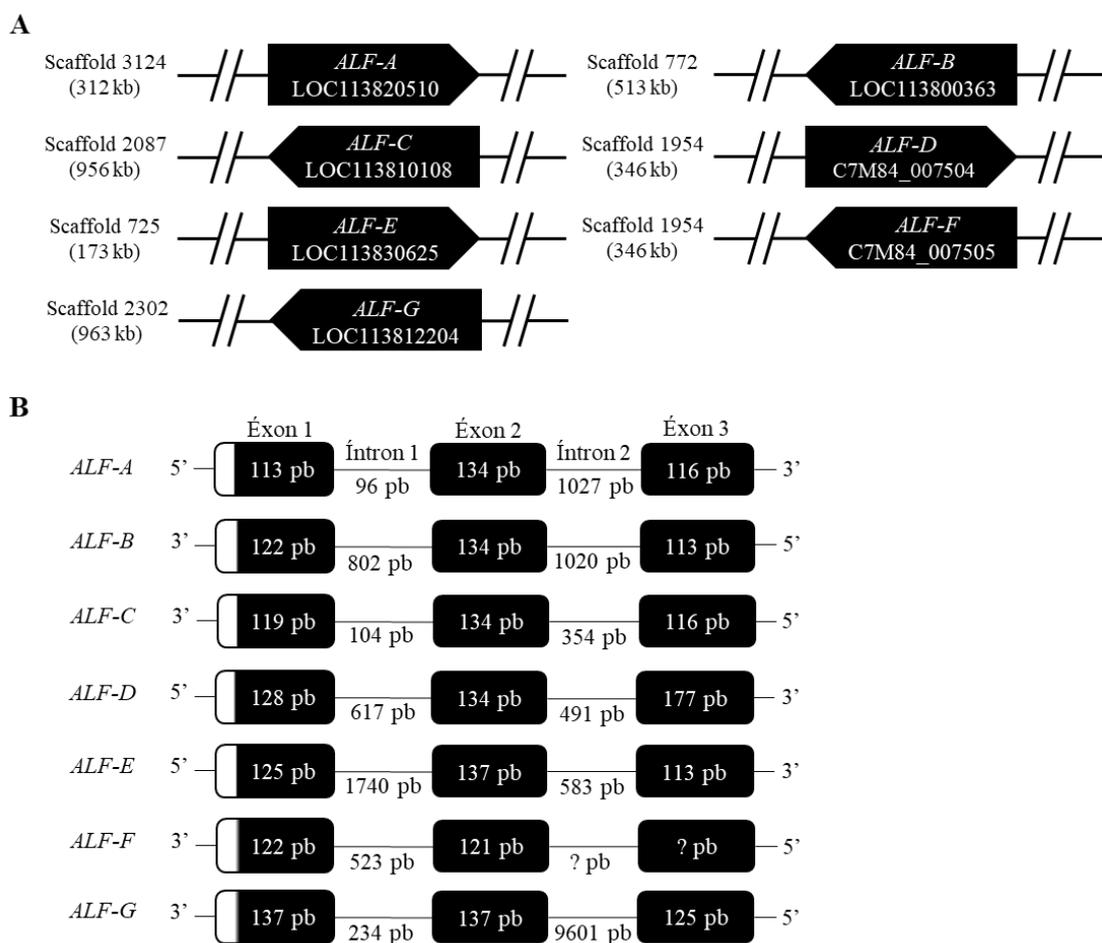
(A) Mapeamento dos genes *STY* (*STY1* e *STY2*). Os genes localizam-se no mesmo *scaffold* (n° 915 com 618 kb) e possuem a mesma orientação. (B) Organização dos genes *STY*. Ambos os genes *STY* encontrados são codificados por dois éxons (caixas pretas) de tamanho idêntico separados por um íntron (linha) de tamanho variado. O peptídeo sinal dessa família (caixa branca) encontra-se codificado no éxon 1.

O mapeamento gênico dos membros da família dos ALFs foi o mais diversificado, pois cada membro foi encontrado num *scaffold* cromossômico diferente. Todas as localizações dos genes *ALF-A* ao *-G*, nos respectivos *scaffolds*, estão apresentados na Figura 3A e totalizam seis diferentes *scaffolds*, com tamanho entre 173 kb e 963 kb. No genoma de *P. monodon*, que foi sequenciado e montado em nível cromossômico, os ALFs podem ser encontrados em pelo menos três cromossomos, analisados em relação aos genes anotados para se saber a localização específica dos ALFs: (cromossomo 8: 3 cópias *ALF-B*; cromossomo 11: 1 cópia *ALF-A*, 2 cópias *ALF-C*, 2 cópias *ALF-D* e 1 cópia *ALF-F*; cromossomo 14: 1 cópia *ALF-E*; cromossomo 40: 1 cópia *ALF-G*).

Devido ao tamanho dos *scaffolds* dos ALFs de *L. vannamei*, que somam cerca de 3 Mb, e à similaridade das sequências aminoacídicas entre *P. monodon* e *L. vannamei* (96% de suporte mínimo na árvore filogenética pelo método *Maximum Likelihood* - MATOS et al., 2018), os resultados sugerem que os ALFs de *L. vannamei* podem estar distribuídos de maneira semelhante (em termos cromossômicos) ao encontrado no outro peneídeo, *P. monodon*. Em *L. vannamei*, todos os genes encontrados possuem uma única cópia gênica e, enquanto os *ALF-A* (LOC113820510), *-D* (C7M84_007504) e *-E* (LOC113830625) encontram-se no *frame* positivo, os genes *ALF-B* (LOC113800363), *-C* (LOC113810108), *-F*

(C7M84_007505) e -G (LOC113812204) estão no frame negativo. Na sequência original do gene *ALF-D*, foi adicionado uma adenina na terceira trinca, tornando-se 5'- ...GTC ACC GAA GAA GAA GCC AAA CCG CAC CTC GTA TAA... -3'. Foi observado ainda que todos os ALFs de *L. vannamei* seguem uma organização muito semelhante. No primeiro éxon está codificado o peptídeo sinal juntamente com a porção N-terminal do peptídeo maduro, seguido do segundo éxon, onde estão codificadas as duas cisteínas responsáveis pela formação do grampo e, por fim, o terceiro éxon contendo o restante do peptídeo (**Fig. 3B**).

Figura 3. Localização e organização dos genes codificantes dos ALFs



(A) Mapeamento dos genes *ALF* (*ALF-A*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E*, *-F* e *-G*). Cada gene localiza-se em um *scaffold* específico com diferentes orientações. (B) Organização dos genes *ALF*. Todos os *ALFs* encontrados são codificados por três éxons (caixas pretas) de tamanho similar separados por dois íntrons (linhas) de tamanho variado. O peptídeo sinal dessa família (caixa branca) encontra-se codificado no éxon 1.

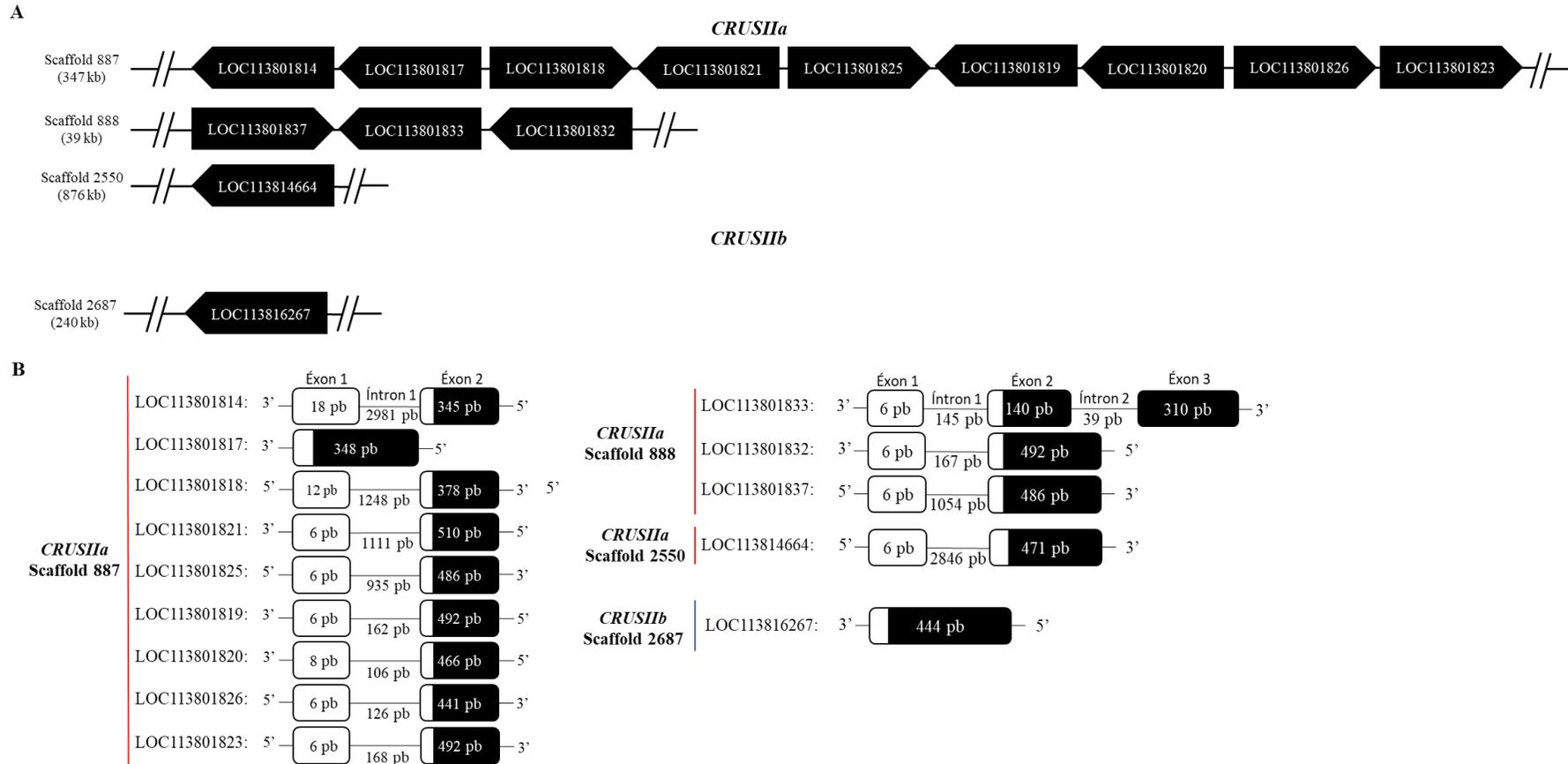
A organização da CDS dos *ALFs* ao longo dos éxons, bem como a distribuição numérica de éxons e íntrons são corroboradas por Liu et al. (2014) para o *ALF-F*, onde esse

AMP também é codificado em três éxons separados por dois íntrons. É importante citar que uma parte incompleta da sequência nucleotídica do gene *ALF-F* foi encontrado também no *scaffold* 1954. Nessa sequência, foram encontrados os nucleotídeos correspondentes aos éxons 1 e 2, bem como o íntron 1, não sendo encontrados o íntron 2 e éxon 3 (**Fig. 3B**). Pelo fato de a sequência nucleotídica do mRNA de *Litvan* ALF-F (utilizada para buscas no genoma) ser idêntica à sequência encontrada parcialmente no gene *ALF-F*, é possível que possa ter ocorrido um erro de montagem dessa sequência no genoma, onde a sequência correspondente ao final do *ALF-F* estaria ausente. A sequência nucleotídica encontrada codifica o início do peptídeo sinal até quatro aminoácidos depois de uma cisteína seguida de prolina, esses dois últimos característicos dos ALFs (MATOS et al., 2018).

Na família das crustinas, aqui representada pelos membros *Crustin Lv* (Tipo IIa) e *Crustin-like Lv* (Tipo IIb), o mapeamento gênico também mostrou-se bem diversificado. Interessantemente, nove cópias gênicas do gene *CRUSIIa* (Tipo IIa *Crustin Lv*) estão localizadas no mesmo *scaffold* (n° 887 com 347 kb), enquanto três localizam-se em um segundo *scaffold* (n° 888 com 39 kb) e uma localiza-se em um terceiro *scaffold* (n° 2550 com 876 kb). Sendo assim, totalizam-se 13 cópias gênicas encontradas para esse gene. O gene *CRUSIIb* (Tipo IIb *Crustin-like Lv*) foi encontrado em um único *scaffold* (n° 2687 com 240 kb), possuindo uma única cópia gênica (**Fig. 4**). Enquanto os genes *CRUSIIa* foram encontrados tanto em frame positivo quanto em frame negativo, o gene *CRUSIIb* foi identificado apenas no frame negativo.

Com relação à organização gênica, os genes *CRUSIIa* mostraram três tipos distintos de organização. Onze cópias correspondem ao primeiro tipo de organização, que possuem dois éxons separados por um íntron. Nessas sequências, foram identificadas no primeiro éxon parte do início da sequência codificadora para o peptídeo sinal e no segundo o restante da sequência juntamente com a sequência codificadora do peptídeo maduro. Uma cópia, correspondente ao segundo tipo de organização, foi identificada possuindo três éxons separados por dois íntrons, onde o primeiro éxon codifica parte do peptídeo sinal, seguido do segundo éxon que codifica o restante do peptídeo sinal e parte do domínio rico em glicina e um terceiro éxon que codifica o restante do peptídeo maduro. Uma única cópia, correspondente ao terceiro tipo de organização, foi identificada por possuir toda a codificação em um único éxon. De maneira semelhante a esse último tipo de organização, o gene *CRUSIIb* possui um único éxon que codifica o peptídeo sinal e o peptídeo maduro (**Fig. 4**).

Figura 4. Localização e organização dos genes codificantes das crustinas



(A) Mapeamento dos genes *CRUSIIa* e *CRUSIIb*. *CRUSIIa* possui no genoma nove cópias gênicas distribuídas no *scaffold* 887 (347 kb), três no *scaffold* 888 (39 kb) e uma no *scaffold* 2550 (876 kb). *CRUSIIb* possui uma cópia gênica no *scaffold* 2687 (240 kb). (B) Organização de cada gene *CRUSIIa* (linha vermelha) e *CRUSIIb* (linha azul). A maior parte das crustinas possui uma organização similar: dois éxons (caixas brancas e pretas) separados por um íntron (linha). Um único gene *CRUSIIa* possui três éxons, enquanto que um outro possui apenas um. Esse último gene possuiu uma organização semelhante ao gene *CRUSIIb*. A sequência inicial do peptídeo sinal dessa família (caixa branca) é codificada no éxon 1 e o restante no éxon 2.

3.2. Expressão basal comparativa dos AMPs de *L. vannamei*

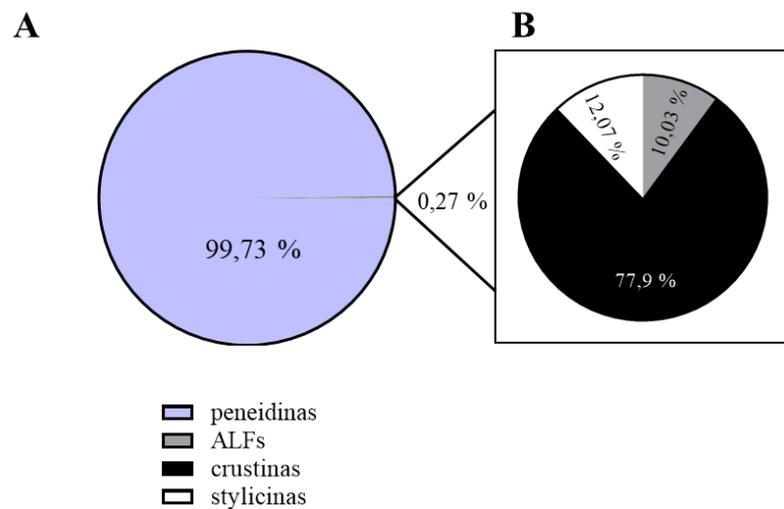
O objetivo dessa análise foi comparar os níveis de expressão basal dos diferentes AMPs nos hemócitos de animais adultos. Para quantificação de cada AMP, foram utilizadas populações totais de hemócitos de cinco indivíduos saudáveis. Foram quantificáveis os transcritos *Litvan* PEN1/2, -PEN3 e -PEN4; *Litvan* ALF-A, -B, -C, -D, -E e -F; Crustin *Lv* (Tipo IIa) e Crustin-like *Lv* (Tipo IIb); *Lvan*-Stylicin1 e *Lvan*-Stylicin2. Os transcritos referentes ao gene *ALF-G* foram detectados nos hemócitos, porém não foram quantificáveis. Isso ocorreu porque, embora exista expressão nos hemócitos, sabe-se que a expressão desse gene é predominante no órgão linfoide, como demonstrado em estudos anteriores nas espécies *L. vannamei* e *F. chinensis* (LI et al., 2019; SUN et al., 2021). Para a determinação dos níveis de expressão gênica basal dos AMPs nos hemócitos, foram analisados os valores absolutos de transcritos por ng de RNA total nos cinco animais.

Foi observado que a família das peneidinas é a mais expressa, representando 99,73% ($9,68 \times 10^9$ cópias/ng de RNA total) da expressão basal de todos os AMPs. As demais famílias somam 0,27% da expressão basal total de AMPs (**Fig. 5A**). Retirando as peneidinas das análises, foi verificado que as crustinas representam a segunda família mais expressa (77,9%) nos hemócitos, com aproximadamente $6,7 \times 10^6$ cópias/ng de RNA total, seguido das stylicinas (12,07%) com 1×10^6 cópias/ng de RNA total e dos ALFs (10,03%) com $8,6 \times 10^5$ cópias/ng de RNA total (**Fig. 5B**).

A alta taxa de expressão basal das peneidinas provavelmente ocorre porque essa família, além de ser exclusivamente hemocitária, também desempenha outras funções biológicas nos camarões. Sabe-se que ocorre um aumento da concentração plasmática de *Litvan* PEN3 nas primeiras horas de contato com microrganismos (DESTOUMIEUX et al., 2000). Essas peneidinas podem estar atuando como citocinas pro-inflamatórias ou quimiocinas, que auxiliam na quimiotaxia dos hemócitos para locais de infecção (LI; SONG, 2010). Além disso, os níveis de expressão podem ser facilmente alterados após desafios com alguns patógenos que são mais específicos. Dessa maneira, as outras famílias de AMPs podem agir numa resposta mais tardia ou mais específica. Algumas crustinas, como crustin $Pm7$ do *P. monodon* (Tipo IIb), é mais expressa entre o período de 12-24 horas em hemócitos de indivíduos desafiados com bactérias *V. harveyi* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva) (ARAYAMETHAKORN et al., 2017). O gene *ALF-E* de *M. japonicus* é mais expresso em camarões desafiados com a bactéria patogênica para humanos *S. aureus* após 12 horas e com a bactéria marinha *V. anguillarum* após 24 horas (JIANG et al., 2015). As stylicinas, por sua vez, são mais expressas em indivíduos desafiados com *V. penaeicida* após 24 horas (DE

LORGERIL et al., 2005) e possuem uma atividade antimicrobiana contra fungos filamentosos (ROLLAND et al., 2010).

Figura 5. Porcentagem dos níveis de transcritos de cada família de AMP nos hemócitos de *L. vannamei*



Porcentagem de transcritos de AMPs em hemócitos circulantes de *L. vannamei*. A família das peneidinas (em roxo) representam a família mais expressa (99,73 %) quando comparada às outras famílias, que juntas totalizam 0,27%. Retirando as peneidinas, as crustinas são os AMPs mais expressos (77,9%), seguidas das stylicinas (12,07%) e dos ALFs (10,03%).

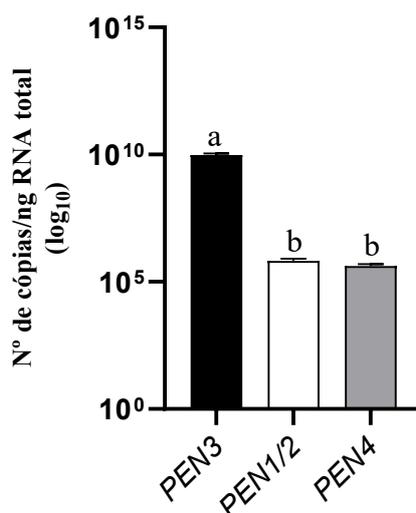
Apesar de as crustinas do Tipo IIa possuírem 13 cópias gênicas, as peneidinas (*PEN3*), que possuem uma cópia gênica cada, são os AMPs mais expressos (**Tab. 1**). Isso indica que a expressão basal não está diretamente relacionada ao número de cópias gênicas, mas provavelmente ao controle da expressão nas regiões promotoras desses genes. Wang et al. (2013) identificaram que a proteína SARM (do inglês, *sterile-alpha and armadillo motif*), quando silenciada, aumenta o nível de expressão das peneidinas e dos ALFs, sugerindo que essa proteína regula negativamente esses AMPs. Outras proteínas, como a *LvIAP2*, quando silenciada, diminui a expressão de peneidinas, crustinas e stylicinas e aumenta a expressão dos ALFs, sugerindo uma regulação positiva para peneidinas, crustinas e stylicinas e negativa para os ALFs (WANG et al., 2013b).

Tabela 1 – Relação entre os números de cópias de mRNA de cada peptídeo comparado a outro. Os valores compreendem a quantidade de vezes (×) que o gene da coluna é mais expresso em relação ao da linha. Os valores entre parênteses referem-se ao número de cópias/ng de RNA total.

	<i>PEN3</i> ($9,67 \times 10^9$)	<i>CRUSIIa</i> ($1,18 \times 10^7$)	<i>ALF-B</i> ($3,39 \times 10^6$)	<i>CRUSIIb</i> ($1,51 \times 10^6$)	<i>Lvan-STY2</i> ($1,34 \times 10^6$)	<i>ALF-E</i> ($1,32 \times 10^6$)	<i>Lvan-STY1</i> ($7,28 \times 10^5$)	<i>PEN1/2</i> ($6,60 \times 10^5$)	<i>PEN4</i> ($4,09 \times 10^5$)	<i>ALF-D</i> ($2,39 \times 10^5$)	<i>ALF-A</i> ($1,30 \times 10^5$)	<i>ALF-C</i> ($7,37 \times 10^4$)	<i>ALF-F</i> ($6,72 \times 10^3$)
<i>PEN3</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>CRUSIIa</i>	8×10^2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ALF-B</i>	$2,8 \times 10^3$	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>CRUSIIb</i>	$6,3 \times 10^3$	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lvan-STY2</i>	$7,1 \times 10^3$	9	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ALF-E</i>	$7,2 \times 10^3$	9	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lvan-STY1</i>	$1,3 \times 10^4$	16	5	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>PEN1/2</i>	$1,4 \times 10^4$	18	5	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
<i>PEN4</i>	$2,3 \times 10^4$	29	8	4	3	3	2	2	0	0	0	0	0
<i>ALF-D</i>	$4,0 \times 10^4$	50	14	6	6	6	3	3	2	0	0	0	0
<i>ALF-A</i>	$7,3 \times 10^4$	91	26	12	10	10	6	5	3	2	0	0	0
<i>ALF-C</i>	$1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^2$	46	21	18	18	10	9	6	3	2	0	0
<i>ALF-F</i>	$1,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	98	61	36	19	11	0

Dentro da família das peneidinas, o membro que mais se destaca é o gene *PEN3*, responsável por 99,99% de toda a expressão dessa família. O gene *PEN3* destaca-se ainda por ser expresso em valores extremamente altos ($9,67 \times 10^9$ cópias/ng de RNA total; **Tab. 1**), seguido do gene *PEN1/2* ($6,6 \times 10^5$ cópias/ng de RNA total) e do gene *PEN4* ($4,1 \times 10^5$ cópias/ng de RNA total), que representam 0,006% e 0,004%, respectivamente. Os dados encontrados para esse gene por O'Leary & Gross (2006), realizado por quantificação relativa, corroboram os nossos achados por quantificação absoluta, onde a expressão basal do gene *PEN3* é maior que o gene *PEN4* ($23.601 \times$) e maior que o gene *PEN1/2* ($14.650 \times$). O gene *PEN1/2* possui expressão equivalente ao gene *PEN4* ($0,62 \times$) (**Fig. 6**).

Figura 6. Níveis de expressão gênica basal dos três membros da família das peneidinas expressos nos hemócitos de *L. vannamei*

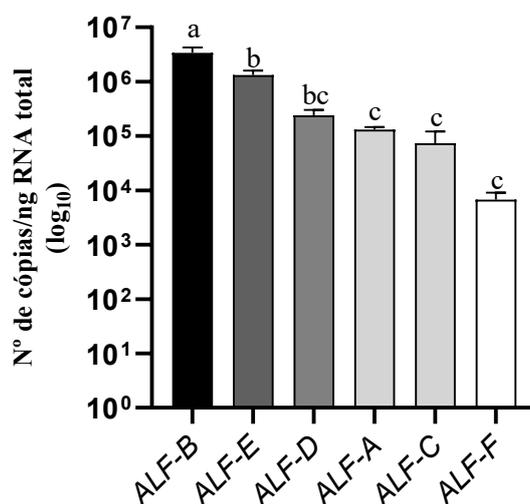


PEN3 é o gene mais expresso da família (99,99 %; $9,67 \times 10^9$ cópias/ng de RNA total), seguido de *PEN1/2* (0,006 %; $6,6 \times 10^5$ cópias/ng de RNA total) e *PEN4* (0,004 %; $4,1 \times 10^5$ cópias/ng de RNA total). As letras acima das barras representam as diferenças estatísticas utilizando o ANOVA one-way com *post-hoc* teste de Tukey ($P < 0,05\%$). O eixo Y do gráfico está apresentado em escala logarítmica (\log_{10}).

Investigando a família dos ALFs, foi identificado que o gene *ALF-B* é o representante mais expresso dessa família (**Fig. 7**), com $3,4 \times 10^6$ cópias/ng de RNA total (**Tab. 1**), corroborando o identificado por Rosa et al. (2013). Esse gene possui valores de expressão $2,6 \times$ maiores quando comparados ao gene *ALF-E* e até mesmo

505 × superiores quando comparados ao gene *ALF-F*. O número de cópias de cada ALF está plotado na Tabela 1.

Figura 7. Níveis de expressão gênica basal dos seis membros da família dos ALFs expressos nos hemócitos de *L. vannamei*



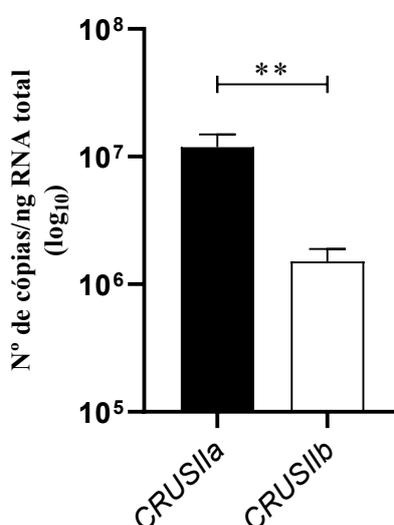
O gene *ALF-B* é o mais expresso da família ($3,4 \times 10^6$ cópias/ng de RNA total), seguido do *ALF-E* ($1,3 \times 10^6$ cópias/ng de RNA total), *ALF-D* ($2,39 \times 10^5$ cópias/ng de RNA total), *ALF-A* ($1,3 \times 10^5$ cópias/ng de RNA total), *ALF-C* ($7,37 \times 10^4$ cópias/ng de RNA total) e *ALF-F* ($6,7 \times 10^3$ cópias/ng de RNA total). As letras acima das barras representam as diferenças estatísticas utilizando o ANOVA one-way com *post-hoc* teste de Fisher's ($P < 0,05\%$). O eixo Y do gráfico está apresentado em escala logarítmica (\log_{10}).

Apesar de alguns membros possuírem uma expressão gênica basal relativamente semelhante (*Litvan* ALF-A, -C, -D, -E, e -F), os ALFs podem responder diferentemente dependendo do estímulo. O peptídeo *Litvan* ALF-E, por exemplo, é ativo contra poucas espécies de bactérias Gram-positivas, como a *Microbacterium maritypicum* e fungos filamentosos como o *Fusarium oxysporum* (MATOS et al., 2018). O peptídeo *Litvan* ALF-C, por sua vez, é ativo contra fungos como o *Fusarium solani* e o *Litvan* ALF-D contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*Bacillus megaterium*) (ROSA et al., 2013). O gene *ALF-B* é o membro que, além de ser o mais expresso em indivíduos saudáveis, seu peptídeo possui um maior espectro de ação, inibindo o crescimento de mais espécies de microrganismos (ROSA et al., 2013). Além desses dados, sabe-se que os genes *ALF-B*, -C, -F e -G, podem ser induzidos em resposta a

injúrias ou DAMPs (do inglês, *Damage-Associated Molecular Pattern*) (MATOS et al., 2018; ROSA et al., 2013) e o gene *ALF-F* ao WSSV (LIU et al., 2014).

Em relação às crustinas do Tipo II, foi observado que o gene mais expresso é *CRUSIIa*. Os níveis basais de expressão de *CRUSIIa* foram $7,85 \times$ maiores que *CRUSIIb* (Fig. 8). O gene *CRUSIIa* possui $1,18 \times 10^7$ cópias/ng de RNA total enquanto o gene *CRUSIIb* possui $1,51 \times 10^6$ cópias/ng de RNA total (Tab. 1).

Figura 8. Níveis de expressão gênica basal das crustinas do Tipo IIa e IIb expressas nos hemócitos de *L. vannamei*

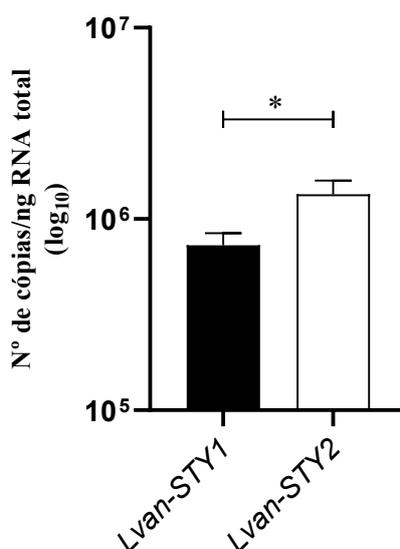


O gene *CRUSIIa* é o mais expresso ($1,18 \times 10^7$ cópias/ng de RNA total) quando comparado ao gene *CRUSIIb* ($1,51 \times 10^6$ cópias/ng de RNA total). O eixo Y do gráfico está apresentado em escala logarítmica (log₁₀). Os asteriscos representam a diferença estatística utilizando o teste t não-pareado ($P < 0,05\%$).

Apesar de serem expressas constitutivamente nos hemócitos, as crustinas são também expressas em outros tecidos, como nas brânquias. Em desafios com bactérias do gênero *Vibrio*, os níveis de expressão das crustinas aumentam nesses tecidos, além de aumentar também no cordão nervoso e intestino médio (BARRETO et al., 2018). Além disso, ainda não se sabe se as crustinas do Tipo II são de fato expressas nesses tecidos ou se isso acontece por uma infiltração hemocitária. Em estudo recente, Koiwai et al. (2018) relataram que as brânquias possuem hemócitos residentes responsáveis pela expressão da crustinas e que o padrão de expressão no órgão é diferente dos hemócitos circulantes.

Em relação aos genes da família das stylicinas foi identificado que o mais expresso é o *Lvan-STY2*, com nível de expressão $1,85 \times$ maior que o gene *Lvan-STY1* (Fig. 9). Além disso, os genes *Lvan-STY2* e *Lvan-STY1* possuem $13,4 \times 10^5$ e $7,28 \times 10^5$ cópias/ng de RNA total, respectivamente (Tab. 1).

Figura 9. Níveis de expressão gênica basal dos dois membros da família das stylicinas expressos nos hemócitos de *L. vannamei*



Lvan-STY2 é o gene mais expresso ($1,34 \times 10^6$ cópias/ng de RNA total) quando comparado a *Lvan-STY1* ($7,28 \times 10^5$ cópias/ng de RNA total). O eixo Y do gráfico está apresentado em escala logarítmica (log₁₀). O asterisco representa a diferença estatística utilizando o teste t não-pareado ($P < 0,05\%$).

Apesar de ser menos expresso em indivíduos não-desafiados, o gene *Lvan-STY1* pode ser modulado nos hemócitos em resposta a infecções pela bactéria Gram-negativa *V. penaeicida* (DE LORGERIL et al., 2005), enquanto que o gene *Lvan-STY2* pode ser modulado em infecções com a bactéria *V. harveyi* (FARIAS et al., 2019). Ambos os genes das stylicinas podem aumentar sua expressão em função dos DAMPs (FARIAS et al., 2019).

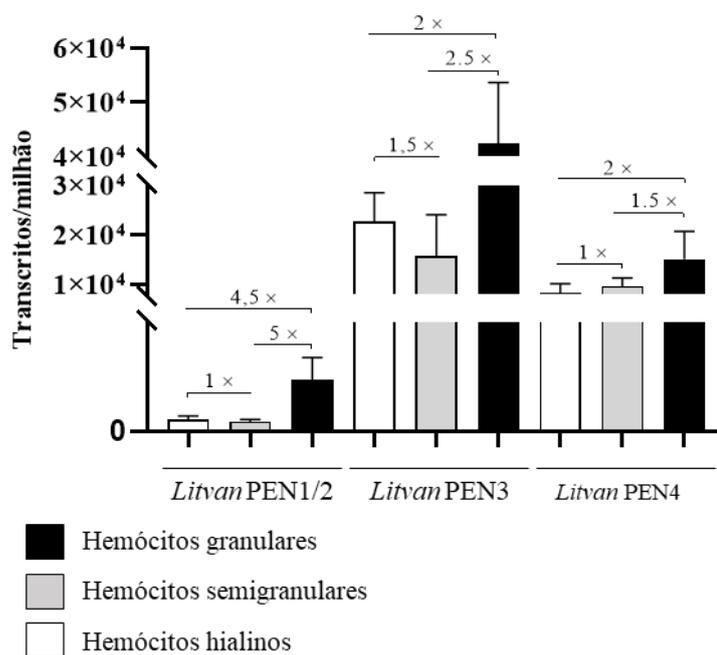
3.3. Determinação dos tipos hemocitários que expressam os AMPs de *L. vannamei*

Na tentativa de determinar quais populações hemocitárias expressam cada um dos membros das quatro famílias de AMPs, foram analisadas bibliotecas de RNA-seq (SRA, do inglês, *Sequence Read-Archive*) dos diferentes tipos hemocitários (granulares,

semigranulares e hialinos) de *L. vannamei* (SUN et al., 2020). Foram buscadas todas as sequências aminoacídicas dos AMPs deste estudo e apenas não foi encontrada a sequência correspondente ao membro *Litvan* ALF-F. As sequências correspondentes à *Lvan-Stylicin2* foram encontradas duas vezes, indicando duas variantes. Contudo, como discutido previamente, não foi encontrado no genoma dois genes *Lvan-STY2*, como verificado por Farias et al. (2019). Os resultados foram plotados por família, e os valores de expressão (em *fold-change*) estão representados nas figuras em relação ao maior valor de expressão.

Todos os membros analisados nesta sessão foram encontrados em todas as populações hemocitárias, possuindo valores de expressão maiores em um determinado tipo celular. Isso pode ocorrer por causa da metodologia de separação de células utilizada por Sun et al. (2020). Nesta metodologia (Percoll®), as populações celulares podem facilmente se contaminar na hora da retirada das diferentes bandas (camadas) obtidas. Na família das peneidinas (*Litvan* PEN1/2, -PEN3 e -PEN4), todos os transcritos mostraram-se mais abundantes em hemócitos granulares, quando comparado aos semigranulares e hialinos (**Fig. 10**). O gene *PEN1/2* foi encontrado sendo mais expresso (939,2 transcritos/milhão) nos hemócitos granulares quando comparado aos semigranulares (176,3 transcritos/milhão) e hialinos (208,8 transcritos/milhão), sendo a expressão entre os hemócitos semigranulares e hialinos equivalente (**Fig. 10**). O gene *PEN3* foi mais expresso em hemócitos granulares (42.431 transcritos/milhão), quando comparados aos semigranulares (15.596 transcritos/milhão) e hialinos (22.647 transcritos/milhão), possuindo uma diferença de expressão de $0,5 \times$ entre os hemócitos semigranulares e hialinos. Por fim, o gene *PEN4* foi encontrado mais expresso em hemócitos granulares (14.992 transcritos/milhão) quando comparado aos semigranulares (9.516 transcritos/milhão) e hialinos (8.215 transcritos/milhão), possuindo expressão similar entre os semigranulares e hialinos. Esse resultado difere do encontrado por Yang et al. (2015) que descreveram que o gene *PEN3* foi aproximadamente $12 \times$ e $3 \times$ mais expresso em hemócitos semigranulares, quando comparados aos granulares e hialinos, respectivamente. Contudo, foi demonstrado por hibridização *in situ* e microscopia eletrônica que as peneidinas, especificamente *PEN3*, podem ser encontradas tanto em hemócitos granulares quanto em hemócitos semigranulares de *L. vannamei* (MUÑOZ et al., 2002).

Figura 10. Distribuição da expressão de peneidinas nas populações hemocitárias

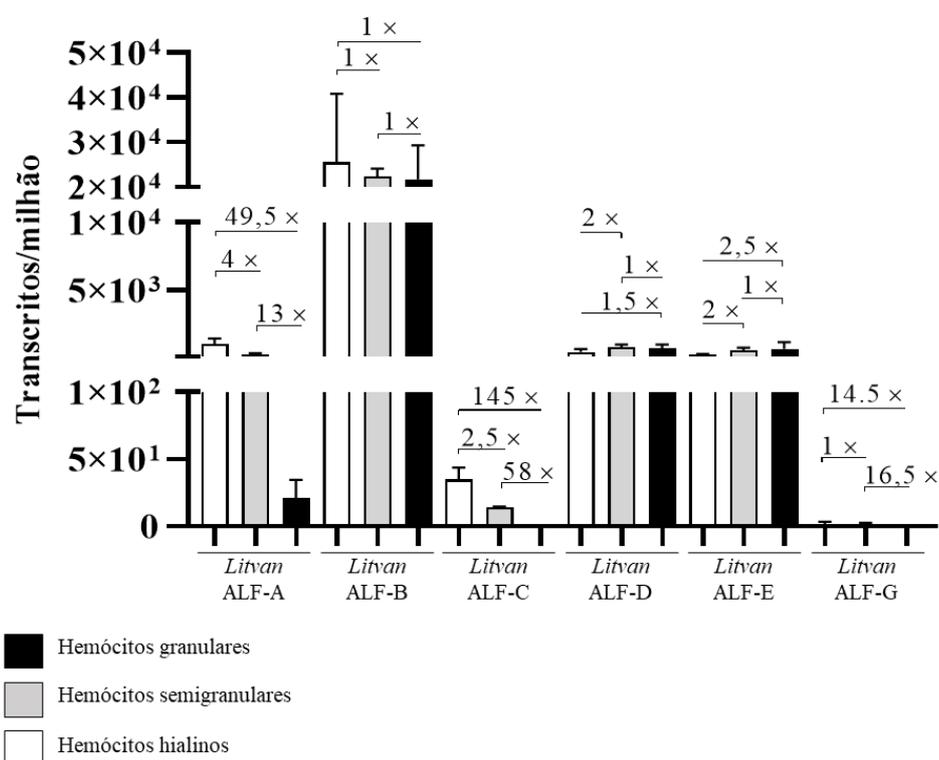


A expressão dos membros (*fold-change*) foi calculada sempre sendo o maior valor dividido pelo menor. O eixo Y refere-se à quantidade de transcritos encontrados por milhão. No eixo X estão representados os membros da família.

Entre todos analisados, os membros da família dos ALFs foram os mais diversificados. Os genes *ALF-A*, *-C* e *-G* foram mais expressos em hemócitos hialinos (1.019, 34,86 e 1.757 transcritos/milhão, respectivamente) e semigranulares (266,9; 13,91 e 1,98 transcritos/milhão, respectivamente) quando comparados aos hemócitos granulares (20,59; 0,24 e 0,12 transcritos/milhão, respectivamente) (**Fig 11**). O gene *ALF-B* mostrou-se o gene mais expresso em todos os tipos celulares, quando comparado aos demais, corroborando o encontrado em análises anteriores. Apesar de possuir a maior taxa de expressão, o gene *ALF-B* possui uma expressão semelhante entre as populações hemocitárias. O gene *ALF-D* possuiu uma expressão relativamente semelhante entre os hemócitos granulares e semigranulares (726,1 e 800,1 transcritos/milhão, respectivamente), sendo mais expresso quando comparado aos hemócitos hialinos (445,6 transcritos/milhão). O gene *ALF-E*, por sua vez, possuiu expressão semelhante entre hemócitos granulares e semigranulares (654,1 e 554,4 transcritos/milhão, respectivamente), sendo 2,5 × mais expresso em hemócitos granulares e 2× mais expresso nos semigranulares, quando comparado aos hialinos (259,4 transcritos/milhão) (**Fig 11**). Essa diversificação de localização hemocitária foi

observada por Somboonwiwat et al. (2008), que analisaram o ALFPm3 do camarão *P. monodon* (homólogo ao ALF-B de *L. vannamei*) por imunohistoquímica. No trabalho, os autores identificaram que ALFPm3 foi encontrado principalmente em hemócitos com formato diversificado no local de injeção do *V. harveyi* e, essas diferenças de formato foram associadas com a degranulação celular.

Figura 11. Distribuição da expressão de ALFs nas populações hemocitárias

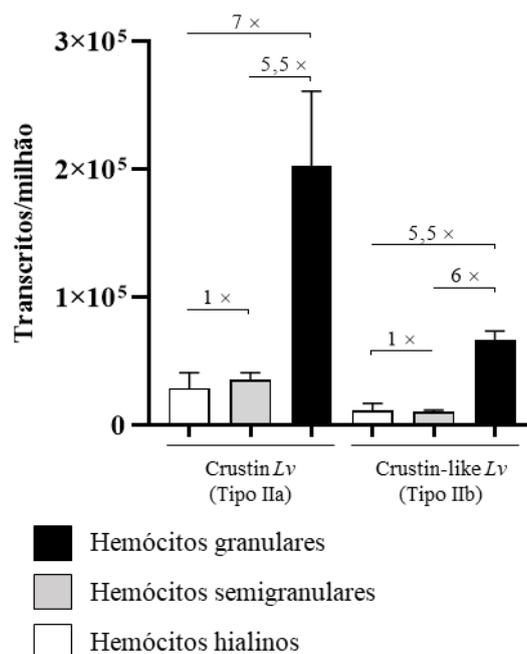


A expressão dos membros (*fold-change*) foi calculada sempre sendo o maior valor dividido pelo menor. O eixo Y refere-se à quantidade de transcritos encontrados por milhão. No eixo X estão representados os membros da família.

Ambos os genes das crustinas do Tipo II (*CRUSIIa* e *CRUSIIb*) mostraram-se mais expressos em hemócitos granulares (202.466 e 66.489 transcritos/milhão, respectivamente), como observado no camarão *Marsupenaeus japonicus* (KOIWA et al., 2017), *Farfantepenaeus paulensis* (BANDEIRA et al., 2020) e *L. vannamei* (SUN et al., 2020) (Fig. 12). O gene *CRUSIIa* foi mais expresso (7 × e 5,5 ×) em hemócitos granulares, que nos hemócitos hialinos e semigranulares (28.802 e 35.325 transcritos/milhão/respectivamente), respectivamente, e possuiu expressão semelhante entre os hemócitos hialinos e semigranulares. O gene *CRUSIIb* seguiu o mesmo padrão

do *CRUSIIa*, sendo $6 \times$ e $5,5 \times$ mais expresso em hemócitos granulares, quando comparado aos semigranulares e hialinos (10.286 e 11.433 transcritos/milhão, respectivamente). A expressão entre os hemócitos hialinos e semigranulares foi semelhante (Fig. 12).

Figura 12. Distribuição da expressão de crustinas nas populações hemocitárias

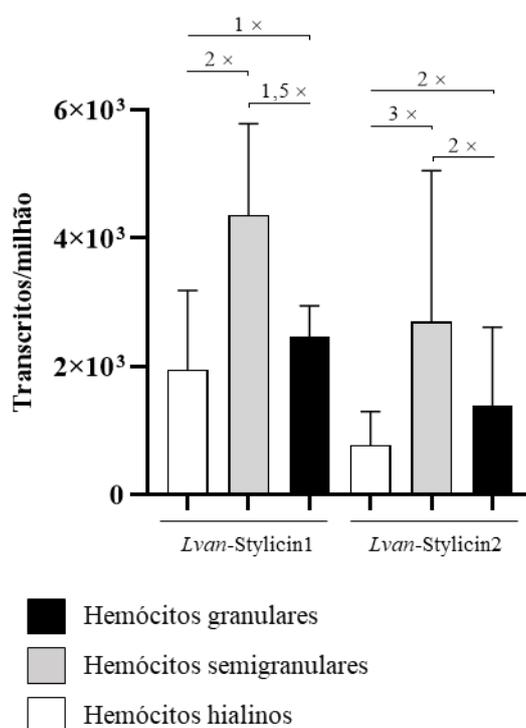


A expressão dos membros (*fold-change*) foi calculada sempre sendo o maior valor dividido pelo menor. O eixo Y refere-se à quantidade de transcritos encontrados por milhão. No eixo X estão representados os membros da família.

Ambas as stylicinas, por sua vez, mostraram-se mais expressas em hemócitos semigranulares (*Lvan-STY1*: 4.363 e *Lvan-STY2*: 2.698 transcritos/milhão) (Fig. 13). No caso do gene *Lvan-STY1*, seus valores de expressão foram $2 \times$ e $1,5 \times$ maiores nos hemócitos semigranulares, comparado aos hialinos e granulares (1.946 e 2.459 transcritos/milhão, respectivamente) e a expressão foi equivalente entre os hialinos e granulares. O gene *Lvan-STY2* foi $3 \times$ e $2 \times$ mais expresso em hemócitos semigranulares quando comparados aos hialinos e granulares (774,5 e 1.381 transcritos/milhão, respectivamente), sendo também $2 \times$ mais expresso em granulares quando comparado aos hialinos. Esse é o primeiro relato de localização hemocitária e nível de transcritos para o gene *Lvan-STY2*. Rolland et al. (2010) também identificaram que *Lsty-Stylicin1* de *L stylirostris* poderia ser encontrada em todos os tipos de hemócitos. Além disso, no

capítulo 1 desta tese foi observada expressão de stylicinas nas células colunares do intestino, indicando que esse AMP não é exclusivamente hemocitário (FARIAS et al., 2019). Todos esses resultados indicam que, embora a expressão dos AMPs ocorra em todos os hemócitos, ela pode ocorrer de maneira maior em hemócitos específicos, como verificado para os genes *PEN1/2*, *PEN3*, *PEN4*, *CRUSIIa*, *CRUSIIb* e *STY2*. Esses genes estão mais expressos em hemócitos granulares ou semigranulares e sabe-se que ambos os tipos celulares podem ser induzidos a degranular ao entrar em contato com moléculas estranhas ao organismo, como o LPS de bactérias gram-negativas e β -1,3 glicanos de fungos (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

Figura 13. Distribuição da expressão de stylicinas nas populações hemocitárias



A expressão dos membros (*fold-change*) foi calculada sempre sendo o maior valor dividido pelo menor. O eixo Y refere-se à quantidade de transcritos encontrados por milhão. No eixo X estão representados os membros da família.

Como conclusão, foram organizados estruturalmente (quantidade de éxons, íntrons e a orientação da transcrição), mapeados e identificados o número de cópias de genes das quatro famílias de AMPs codificados por gene: peneidina (*PEN1/2*, *PEN3* e *PEN4*), crustinas (*CRUSIIa* e *CRUSIIb*), stylicinas (*STY1* e *STY2*) e ALFs (*ALF-A*, *-B*, -

C, *-D*, *-E*, *-F* e *-G*). Foi observado ainda que dentre todos os membros analisados, o gene *PEN3* é o mais expresso comparado aos demais membros de todas as famílias, seguido das famílias crustina, stylicina e ALF. O fato de ser amplamente mais expresso, sugere que esse gene, que foi identificado previamente na literatura, pode estar envolvido em outras funções não-imunológicas. Cada família possuiu um membro mais expresso que os demais em camarões sadios e não-desafiados e um valor de expressão maior em um único tipo de hemócito, que elucidada a localização dos AMPs nos hemócitos.

VI. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados apresentados no capítulo 1 desta tese relatam pela primeira vez, membros da família das stylicinas (*Lvan-Stylicin1* e *Lvan-Stylicin2*) no camarão *L. vannamei* (FARIAS et al., 2019). Além de sua caracterização, os resultados trouxeram a descrição do primeiro peptídeo aniônico presente no interior de células colunares do intestino. Embora inédito em camarões peneídeos, a identificação de AMPs no epitélio intestinal não é surpreendente, uma vez que já foram identificados outros tipos de AMPs nas células intestinais em outros modelos de invertebrados. Na mosca da fruta *D. melanogaster*, por exemplo, essa expressão nas células epiteliais do intestino ocorre e é regulada pela via de sinalização IMD (do inglês, *immune deficiency*) (BUCHON; BRODERICK; LEMAITRE, 2013). Essa via, juntamente com a via *Toll*, foram relatadas como reguladoras do AMP crustin $Pm7$ no camarão *P. monodon* (ARAYAMETHAKORN et al., 2017). Em *D. melanogaster*, também foi observado que moscas deficientes na ativação da via IMD são mais susceptíveis a infecções, provavelmente por não produzirem quantidades suficientes de efetores antimicrobianos no intestino. Com isso, o presente trabalho sugere que a presença de stylicinas nas células colunares do intestino ocorra pela via IMD, que é fundamental na defesa contra microrganismos no órgão (BUCHON; BRODERICK; LEMAITRE, 2013). Além disso, a ampla identificação de stylicinas em outros tecidos do camarão, observados por PCR semiquantitativa, pode derivar de infiltração hemocitária, tendo em vista que (i) o sistema circulatório dos crustáceos é semiaberto e que (ii) não foram observadas marcações nos tecidos analisados por imunohistoquímica (dados não apresentados) (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2007).

Em infecções com o patógeno *V. harveyi*, foi observado que o gene *Lvan-STY2* é modulado positivamente nos hemócitos de indivíduos infectados, provavelmente porque esse peptídeo é capaz de responder a cepas patogênicas do gênero *Vibrio*, como observado por Rolland et al. (2010) com *V. penaeicidae*. Em experimentos que envolvem o inóculo viral e de macerados de tecidos de animais sadios, foi observado que ambas as stylicinas aumentam sua expressão nos hemócitos em ambos os casos. Esses dados sugerem fortemente que esses genes são regulados também em função dos padrões moleculares associados ao danos (do inglês, *danger/damage-associated molecular patterns*, DAMPs) e que por isso esses AMPs podem estar envolvidos em uma inflamação primária e em processos de cicatrização, como proposto para as peneídeos (DESTOUMIEUX et al., 2000).

Além de todos esses fatos, é sugerido que as stylicinas, juntamente com outros AMPs desse estudo, atuem em processos infecciosos desde as fases larvais, principalmente contra *Vibrio* spp. e *Fusarium oxysporum* (ROLLAND et al., 2010). A identificação de stylicinas nas fases iniciais do desenvolvimento sugere uma importante participação dessas moléculas durante o desenvolvimento do camarão, particularmente em um momento onde o sistema imune não está completamente formado, semelhantemente ao encontrado para a Crustin-like *Lv* (Tipo IIb) e outros AMPs (BARRETO et al., 2018; MATOS et al., 2018; QUISPE et al., 2016b).

A organização gênica das outras famílias de AMPs em *L. vannamei* até então era incompleta e foi descrita apenas para alguns membros anteriormente ao sequenciamento do genoma do camarão. Sabe-se que todos os membros dessas famílias são codificados por pelo menos um gene, não sendo identificado e descrito até o momento o mecanismo de *splicing* alternativo nesses genes. Além disso, não se sabia até então a quantidade de cópias no genoma para cada gene (MATOS et al., 2018; ROLLAND et al., 2010; TASSANAKAJON et al., 2010; WU et al., 2019). No capítulo 2 foi descrito a organização gênica de vários membros de cada família.

Nas quatro famílias de AMPs codificadas por gene, foram descritas aqui a organização gênica dos genes *PEN1/2*, *PEN3* e *PEN4* (peneidinas), *ALF-A*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E*, *-F* e *-G* (ALFs), *CRUSIIa* e *CRUSIIb* (crustinas) e *Lvan-STY1* e *Lvan-STY2* (stylicinas). Quispe et al. (2016) descreveram que as *Litvan* *PEN3* são os peptídeos mais tardios a serem produzidos no desenvolvimento e que todos os outros existem em fases larvais. Embora isso ocorra, foi identificado que o gene *PEN3* é de longe o mais expresso em indivíduos adultos e saudáveis, com valores que atingem 99,73% de expressão quando comparados com as crustinas, stylicinas e ALFs do presente estudo. A distribuição hemocitária da família das peneidinas, analisada por transcrito em células separadas por Percoll® (SUN et al., 2020), é predominante em hemócitos granulares. Essa observação, principalmente do peptídeo *Litvan* *PEN3*, difere do encontrado em análises citométricas realizadas por Yang et al. (2015a). Nesta tese, foi tentado identificar as células por citometria-de-fluxo, no entanto, o perfil celular analisado na hemolinfa de mais de 20 animais (dados não apresentados) não foi possível separar as três populações hemocitárias. Na maior parte dos casos, os hemócitos granulares não se separavam dos semigranulares, devido à complexidade dos dois tipos ser praticamente idêntica. Seu alto valor de expressão, juntamente com o aumento

descrito na concentração plasmática de *Litvan* PEN3 nas primeiras horas de contato com microrganismos (DESTOUMIEUX et al., 2000), sugerem fortemente que as peneidinas podem ser exocitadas ou degranuladas de hemócitos granulares (MUÑOZ et al., 2002), atuando assim em outros processos imunológicos, como a quimiotaxia dos hemócitos para locais de infecção, como já identificado e descrito por Li & Song (2010).

Para a família dos ALFs, foi identificado que a distribuição hemocitária do *ALF-B* é igual em todos os tipos celulares e mais alta quando comparado aos outros membros. Com base em resultados de trabalhos de infecção experimental, sugere-se que o *ALF-B* possui uma alta expressão nos três tipos celulares, pois eles são responsáveis por controlar e evitar o espalhamento de patógenos no organismo, como a bactéria Gram-negativa *V. harveyi* (SOMBOONWIWAT et al., 2008) e fungos *F. solani* (MACHADO et al., 2021). Ponprateep et al. (2012) identificaram que seu silenciamento e posterior infecção com a mesma bactéria, leva a morte de mais de 80% dos camarões *P. monodon*.

Na família das crustinas, especificamente as crustinas do Tipo II (*CRUSIIa* e *CRUSIIb*), seus membros possuem organização gênica muito diversa. Em *L. vannamei*, não há estudos sobre a quantificação basal desses membros em indivíduos adultos sadios. Nesta tese, foi identificado que o gene *CRUSIIa* é $7,85 \times$ mais expresso que o *CRUSIIb*. Nesse caso, a maior expressão pode ocorrer porque as crustinas do Tipo IIa possuem 13 cópias gênicas, comparadas a uma única da crustina Tipo IIb. Ambos os tipos possuem um perfil de expressão em hemócitos semelhante ao encontrado para as peneidinas, sendo mais expressos em hemócitos granulares.

Os AMPs aqui descritos são importantes componentes do sistema imunológico de camarões que interagem primeiramente com microrganismos, seja em órgãos específicos ou na própria hemolinfa dos animais. Essas moléculas apresentam um alto potencial terapêutico, podendo atuar como antibióticos naturais devido a suas interações com a bicamada lipídica ou moléculas específicas no citosol dos patógenos, não apresentando danos para os sistemas do camarão (MATOS; ROSA, 2021; WILMES et al., 2011). Os achados aqui nesta tese, que inclui desde as sequências e localização genômica, bem como as sequências de RNAm e os valores de transcrição naturais desses AMPs em hemócitos não estimulados, ampliam o conhecimento acerca das famílias de AMPs de *L. vannamei*. Essa espécie é a mais cultivada no mundo e patógenos como o WSSV e *Vibrio* spp. podem matar 100% dos animais cultivados em

poucos dias. Por esse motivo é importante se conhecer a fundo o sistema imune dessa espécie, na tentativa de selecionar animais mais resistentes e estudar as possibilidades de se produzir e aplicar os AMPs como antibióticos naturais nos cultivos.

VII. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

VII.1. Conclusões

- A família das stylicinas em *L. vannamei* possui assinatura molecular característica da família em camarões peneídeos. Sua composição inclui 13 cisteínas e ponto isoelétrico aproximado de 5.
- As stylicinas são os primeiros AMPs codificados por gene identificados em células colunares de toda extensão do intestino em camarões *L. vannamei* sadios e uma função secundária foi sugerida para essa família, a função de DAMP.
- O mapeamento e a organização gênica dos AMPs de *L. vannamei* é bem diversificado, o que inclui AMPs multigênicos e em ambos os *frames*, podendo se localizar em diferentes *scaffolds* em um mesmo cromossomo.
- A família das peneidinas é a mais expressa, tendo como responsável por altos valores de expressão o gene *PEN3*, sugerindo-se possuir outras funções não-imunológicas.
- Os genes *ALF-B*, *CRUSIIa* e *STY2* são os membros mais expressos das famílias ALFs, crustinas e stylicinas, respectivamente.
- A distribuição hemocitária das peneidinas *Litvan* PEN1/2, PEN3 e PEN4 e das crustinas *Crustin Lv* (Tipo IIa) e *Crustin-like Lv* (Tipo IIb) são maiores em hemócitos granulares.
- A distribuição hemocitária dos ALFs (*Litvan* ALF-A ao -G) é mais complexa, possuindo membros mais expressos em hemócitos hialinos e membros mais expressos em hemócitos granulares.
- A distribuição hemocitária das stylicinas (*Lvan-Stylicin1* e *Lvan-Stylicin2*) é maior em hemócitos semigranulares.
- Todas essas informações são importantes características de cada peptídeo em cada família para futuros estudos com populações específicas de hemócitos.

VII.2. Perspectivas

- Identificar pela técnica de imuno-histoquímica em cortes do cefalotórax e de toda extensão do organismo a localização das outras famílias de peptídeos antimicrobianos.

- Padronizar e separar os hemócitos por centrifugação de gradiente para se obter subpopulações de hemócitos de maneira mais pura e, posteriormente, identificar o perfil de expressão dos AMPs em um n amostral maior.
- Investigar o espectro de ação dos AMPs, especialmente das stylicinas, em diferentes microrganismos.

REFERÊNCIAS

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.

APPRILL, A. Marine animal microbiomes: Toward understanding host-microbiome interactions in a changing ocean. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, n. JUL, p. 1–9, 2017.

ARANGUREN CARO, L. F. et al. Acute hepatopancreatic necrosis disease (VP AHPND), a chronic disease in shrimp *Penaeus vannamei* population raised in latin America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 174, n. June, p. 107424, 2020.

ARAYAMETHAKORN, S. et al. Characterization of molecular properties and regulatory pathways of CrustinPm1 and CrustinPm7 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 67, p. 18–29, 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.

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, p. 294–299, 2020.

BARRACCO, M. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. **RANZANI-PAIVA, MJ T; TAKEMOTO**, p. 49–72, 2004.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. **Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões**. [s.l: s.n.].

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANGEL, J. (Eds.). . **Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. 2ª ed. Panamá: OIRSA, 2014. v. 53p. 237–306.

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. 31, 16 jan. 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, 1 jun. 2002.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.

BRIGGS, M. et al. **Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific.** Disponível em: <<http://www.fao.org/3/ad505e/ad505e00.htm>>.

BROCKTON, V.; HAMMOND, J.; SMITH, V. Gene characterisation, isoforms and recombinant expression of carcenin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 5, p. 943–949, fev. 2007.

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

BUCHON, N.; BRODERICK, N. A.; LEMAITRE, B. Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 615–626, 29 set. 2013.

CHANG, C. C. et al. The known two types of transglutaminases regulate immune and stress responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 59, p. 164–176, 2016.

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

DE LA VEGA, E. et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (*LvALF*): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1916–1925, abr. 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, abr. 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-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, 14 dez. 2001.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. et al. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, 26 maio 2016.

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

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

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, jan. 2013.

FAO. **GLOBEFISH - Information and Analysis on World Fish Trade**. Disponível em: [<https://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/1416629/>](https://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/1416629/).

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, mar. 2019.

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

GONCALVES, P. et al. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, fev. 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, set. 2001.

JIANG, H.-S. et al. A new group of anti-lipopolysaccharide factors from *Marsupenaeus japonicus* functions in antibacterial response. **Developmental & Comparative**

- Immunology**, v. 48, n. 1, p. 33–42, jan. 2015.
- JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 213–236, 2006.
- KANG, C. J. et al. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 7, p. 1535–1543, 2007.
- KIBENGE, F. S. Emerging viruses in aquaculture. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 97–103, 2019.
- KOIWAI, K. et al. Extracellular trap formation in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) hemocytes is coupled with c-type lysozyme. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 52, p. 206–209, 2016.
- KOIWAI, K. et al. Two hemocyte sub-populations of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Molecular Immunology**, v. 85, p. 1–8, 2017.
- KOIWAI, K. et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals penaeid shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process. **eLife**, v. 10, p. 1–31, 2021.
- KOIWAI, K.; KONDO, H.; HIRONO, I. The immune functions of sessile hemocytes in three organs of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* differ from those of circulating hemocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 78, n. January, p. 109–113, 2018.
- LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 323, 4 dez. 2011.
- LI, C. Y.; SONG, Y. L. Proline-rich domain of penaeidin molecule exhibits autocrine feature by attracting penaeidin-positive granulocytes toward the wound-induced inflammatory site. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, n. 6, p. 1044–1052, 2010.
- LI, S. et al. Characterization of a lymphoid organ specific anti-lipopolysaccharide factor from shrimp reveals structure-activity relationship of the LPS-binding domain. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, 2019.
- LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174–183, 2012.
- LIU, H. T. et al. Identification and expression analysis of a novel stylicin antimicrobial peptide from Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). **Fish and Shellfish**

- Immunology**, v. 47, n. 2, p. 817–823, dez. 2015.
- LIU, J. et al. A new anti-lipopolysaccharide factor (ALF) gene with its SNP polymorphisms related to WSSV-resistance of *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 39, n. 1, p. 24–33, 2014.
- LIU, S. et al. Hemocyte-Mediated Phagocytosis in Crustaceans. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. March, p. 1–9, 2020.
- MACHADO, L. G. V. et al. Farfantepenaeus gene-encoded antimicrobial peptides: Identification, molecular characterization and gene expression in response to fungal infections. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 182, p. 107586, jun. 2021.
- MATOS, G. 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. 381, 11 out. 2018.
- MATOS, G. M.; ROSA, R. D. On the silver jubilee of crustacean antimicrobial peptides. n. May, p. 1–19, 2021.
- MOLINA-AJA, A. et al. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 213, n. 1, p. 7–12, 2002.
- 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, 1 jun. 2002.
- MUTA, T.; IWANAGA, S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 1, p. 41–47, fev. 1996.
- NG, T. H. et al. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 41, n. 4, p. 644–651, 2013.
- O'LEARY, N. A.; GROSS, P. S. Genomic structure and transcriptional regulation of the penaeidin gene family from *Litopenaeus vannamei*. **Gene**, v. 371, n. 1, p. 75–83, 2006.
- PILOTTO, M. et al. Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 83, 8 ago. 2018.
- PILOTTO, M. R. **Envolvimento do intestino médio na imunidade de *Litopenaeus vannamei* em resposta ao WSSV e ao sistema de cultivo**. Florianópolis: Universidade

Federal de Santa Catarina, 2019.

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

QUISPE, R. L. et al. Transcriptional profiling of immune-related genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ontogenesis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 58, p. 103–107, 2016a.

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

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, mar. 2010.

ROSA, R. D. et al. Functional Divergence in Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors (ALFs): From Recognition of Cell Wall Components to Antimicrobial Activity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67937, 4 jul. 2013.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Isj**, v. 7, n. 1824–307X, p. 262–284, 2010.

SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, fev. 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.; DESBOIS, A. P.; DYRYNDA, E. A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1213–1262, 2010.

SÖDERHÄLL, I. Crustacean hematopoiesis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 58, p. 129–141, 2016.

- SOMBOONWIWAT, K. et al. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 10, p. 1170–1176, 2008.
- SOONTHORNCHAI, W. et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 1, p. 19–28, 2010.
- SOONTHORNCHAI, W. et al. Interaction of vibrio spp. with the inner surface of the digestive tract of *Penaeus monodon*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–18, 2015.
- SUN, M. et al. Isolation and transcriptome analysis of three subpopulations of shrimp hemocytes reveals the underlying mechanism of their immune functions. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 108, n. March, p. 103689, 2020.
- SUN, M. et al. A lymphoid organ specific anti-lipopolysaccharide factor from *Litopenaeus vannamei* exhibits strong antimicrobial activities. **Marine Drugs**, v. 19, n. 5, 2021.
- 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, mar. 1982.
- TASSANAKAJON, A. et al. Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp. **Marine Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 487–505, 2010.
- TASSANAKAJON, A. et al. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 954–967, 2013.
- TASSANAKAJON, A.; SOMBOONWIWAT, K.; AMPARYUP, P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 48, n. 2, p. 324–341, fev. 2015.
- THITAMADEE, S. et al. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, v. 452, p. 69–87, 2016.
- TRAN, L. et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, n. 1, p. 45–55, 2013.
- UENGWETWANIT, T. et al. A chromosome-level assembly of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) genome facilitates the identification of growth-associated genes.

Molecular Ecology Resources, v. 21, n. 5, p. 1620–1640, 2021.

VAN HOLDE, K. E.; MILLER, K. I.; DECKER, H. Hemocyanins and Invertebrate Evolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15563–15566, 2001.

WANG, P. H. et al. *Litopenaeus vannamei* Sterile-Alpha and Armadillo Motif Containing Protein (LvSARM) Is Involved in Regulation of Penaeidins and antilipoplysaccharide factors. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–15, 2013a.

WANG, P. H. et al. Analysis of Expression, Cellular Localization, and Function of Three Inhibitors of Apoptosis (IAPs) from *Litopenaeus vannamei* during WSSV Infection and in Regulation of Antimicrobial Peptide Genes (AMPs). **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–20, 2013b.

WANG, Y. T. et al. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, n. 3, p. 249–259, 2002.

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

WU, B. et al. Identification and function of penaeidin 3 and penaeidin 5 in *Fenneropenaeus merguensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 89, n. November 2018, 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, C. C. et al. Immune gene expression for diverse haemocytes derived from pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, n. 1, p. 265–271, 2015a.

YANG, H. T. et al. Catalase eliminates reactive oxygen species and influences the intestinal microbiota of shrimp. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 47, n. 1, p. 63–73, 2015b.

YANG, H. T. et al. Dual oxidases participate in the regulation of intestinal microbiotic homeostasis in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 59, p. 153–163, 2016.

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, set. 2003.

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

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

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Sequências gênicas das stylicinas disponíveis no capítulo 1 (Supplementary data).

Lvan-STY1 gene

Lvan-STY1 [MH108959] CTGCACCGCATCCCTCCTGCCATCATGAGACCTTCACTCA GCTCTCTCTTTTTCTCTTAT
 Lvan-STY1 [MH108961] CTGCACCGCATCCCTCCTGCCATCATGAGACCTTCACTCA GCTCTCTCTTTTTCTCTTAT

Lvan-STY1 [MH108959] TGATTCCGATCCCGCACACTCA CAA GGAATCTTCCTTTTGAAGTTAGCTGCAGCAGAG
 Lvan-STY1 [MH108961] TGATTCCGATCCCGCACACTCA CAA GGAATCTTCCTTTTGAAGTTAGCTGCAGCAGAG

Lvan-STY1 [MH108959] ACCGCTCTTTTTTATTATTATTTTGAACCTCAGTGTGTAATGAATCGAAGCAAGTCTG
 Lvan-STY1 [MH108961] ACCGCTCTTTTTTATTATTATTTTGAACCTCAGTGTGTAATGAATCGAAGCAAGTCTG

Lvan-STY1 [MH108959] GTTATTCCTATTGGAGGAAAAATAGATTGTCGTTATAGTACTATGTTGATGGCAATAATG
 Lvan-STY1 [MH108961] GTTATTCCTATTGGAGGAAAAATAGATTGTCGTTATAGTACTATGTTGATGGCAATAATG

Lvan-STY1 [MH108959] ATGCTCTAAATGATAATGACAGCAATGGTTATTTCCCTTTTATTTTCCATTTTGGACTT
 Lvan-STY1 [MH108961] ATGCTCTAAATGATAATGACAGCAATGGTTATTTCCCTTTTATTTTCCATTTTGGACTT

Lvan-STY1 [MH108959] GCTTGTCTTGTTCAGCACCACCTTACA GCAACTCCGGCTCGAAACTTCCA TCGCTACCA
 Lvan-STY1 [MH108961] GCTTGTCTTGTTCAGCACCACCTTACA GCAACTCCGGCTCGAAACTTCCA TCGCTACCA

Lvan-STY1 [MH108959] CAAGACTGCCCA CCGTCCCATATGATGATGACTCTCCGACTGCCGTGCA TCCCGGCTG
 Lvan-STY1 [MH108961] CAAGACTGCCCA CCGTCCCATATGATGATGACTCTCCGACTGCCGTGCA TCCCGGCTG

Lvan-STY1 [MH108959] TGTACAGGCTCTGCCACCATATTA CTATATCATCTGCAATGCGGCTACCATAGCTCCGAA
 Lvan-STY1 [MH108961] TGTACAGGCTCTGCCACCATATTA CTATATCATCTGCAATGCGGCTACCATAGCTCCGAA

Lvan-STY1 [MH108959] TGTCCCGGCTCTCTCTGACCCCTCCGAAACTCCCA TCCCGGCTGCA TCAAAAAGCGA
 Lvan-STY1 [MH108961] TGTCCCGGCTCTCTCTGACCCCTCCGAAACTCCCA TCCCGGCTGCA TCAAAAAGCGA

Lvan-STY1 [MH108959] GCCTATAAAGCATAA
 Lvan-STY1 [MH108961] GCCTATAAAGCATAA

Lvan-STY2 gene

Lvan-STY2 [MH108960] CCTCTACTGCTCCTCTCTACTAGCCCA ACTCTGCA CCGCATCCCTCCTGCCATCATCAACA
 Lvan-STY2 [MH108962] CCTCTACTGCTCCTCTCTACTAGCCCA ACTCTGCA CCGCATCCCTCCTGCCATCATCAACA

Lvan-STY2 [MH108960] CCTACACTCA GCTCTCTCTTTTTCTCTTATTGCTTGGATGCGCCACA CCA CAAGCAT
 Lvan-STY2 [MH108962] CCTACACTCA GCTCTCTCTTTTTCTCTTATTGCTTGGATGCGCCACA CCA CAAGCAT

Lvan-STY2 [MH108960] CTTCCTTTTGAAGTTAAGCTGGCCAGAGACCGCTCTTTTTTATTTCCTATTTTGGCTAT
 Lvan-STY2 [MH108962] CTTCCTTTTGAAGTTAAGCTGGCCAGAGACCGCTCTTTTTTATTTCCTATTTTGGCTAT

Lvan-STY2 [MH108960] TGTAATAAGTAGATGCTAGTCTGTTATTATTACTGAAGAAAAAATAATACTCTGCTAT
 Lvan-STY2 [MH108962] TGTAATAAGTAGATGCTAGTCTGTTATTATTACTGAAGAAAAAATAATACTCTGCTAT

Lvan-STY2 [MH108960] GTAACGAATGGCAAAAAAGATGCTCTAAAAGATAATGATAGCAATGTTTACTTCCTTTTT
 Lvan-STY2 [MH108962] GTAACGAATGGCAAAAAAGATGCTCTAAAAGATAATGATAGCAATGTTTACTTCCTTTTT

Lvan-STY2 [MH108960] ATTTTCCA TCTTGGCTTGCCTTGTCTTGTTCAGCACA CCGGCTCGACTCCCGGCTGG
 Lvan-STY2 [MH108962] ATTTTCCA TCTTGGCTTGCCTTGTCTTGTTCAGCACA CCGGCTCGACTCCCGGCTGG

Lvan-STY2 [MH108960] GAACTCCATGCCAACCACAAGACTGCCACCGCTGCCATATGATGATGACTCTCCCAAG
 Lvan-STY2 [MH108962] GAACTCCATGCCAACCACAAGACTGCCACCGCTGCCATATGATGATGACTCTCCCAAG

Lvan-STY2 [MH108960] TCCAGCAATTA CCGGCTCTCA CCACTGCCCGCATATTCATATAGCATGCA CTGCCCT
 Lvan-STY2 [MH108962] TCCAGCAATTA CCGGCTCTCA CCACTGCCCGCATATTCATATAGCATGCA CTGCCCT

Lvan-STY2 [MH108960] TTCTACCA CAGCTGCTTATCTCGGCA CCGTCTCTCTCA CCGCTGCCAAGCTCCATGCCC
 Lvan-STY2 [MH108962] TTCTACCA CAGCTGCTTATCTCGGCA CCGTCTCTCTCA CCGCTGCCAAGCTCCATGCCC

Lvan-STY2 [MH108960] CACTTCATCAAAAA CCGACCTATAA AGATAA
 Lvan-STY2 [MH108962] CACTTCATCAAAAA CCGACCTATAA AGATAA

APÊNDICE 2 – Características do peptídeo maduro das stylicinas disponíveis no capítulo 1 (Supplementary data).

Page 1

Stylicin	GenBank [Reference]	Signal peptide	Mature peptide			
		N° aa	N° aa	MW	pI	
<i>L. vannamei</i>	<i>Lvan</i> -Stylicin1 (82-residue peptides)	MH108957 [present study]	22	82	8.83	4.98
		MH108959 [present study]	22	82	8.83	4.98
		MH108961 [present study]	22	82	8.83	4.98
		FE124653 [EST database]	22	82	8.83	4.98
		FE125173 [EST database]	22	82	8.83	4.98
		GETD01027084 [TSA database]	22	82	8.83	4.98
	<i>Lvan</i> -Stylicin1 (83-residue peptides)	<i>Lv</i> VICP1 [Wang et al., 2013]	22	83	8.99	4.98
		FE179060 [EST database]	22	83	8.97	5.19
		FE156583 [EST database]	22	83	9.02	4.98
	<i>Lvan</i> -Stylicin2	MH108958 [present study]	22	82	8.99	4.47
		MH108960 [present study]	22	82	8.99	4.47
		MH108962 [present study]	22	82	9.01	4.47
		<i>Lv</i> VICP2 [Wang et al., 2013]	22	82	9.01	4.47
		GETD01027083 [TSA database]	22	82	9.01	4.47
		GET201053100 [TSA database]	22	82	8.99	4.69
GFRP01011277 [TSA database]		22	82	9.01	4.47	
<i>L. stylirostris</i>	<i>Lsty</i> -Stylicin1	EU177435 [Rolland et al., 2010]	22	82	8.93	5.00
		EU177436 [Rolland et al., 2010]	22	82	9.03	5.00
	<i>Lsty</i> -Stylicin2	GM615897 [GenBank]	22	82	8.93	5.00
		EU177437 [Rolland et al., 2010]	22	82	8.93	4.74
<i>M. japonicus</i>	<i>Mjap</i> -Stylicin	KR063277 [Liu et al., 2015]	22	82	8.69	4.79
		NIUR011088360 [WGS database]	22	82	8.69	4.79

ANEXOS

ANEXO 1 – Artigo científico referente ao capítulo 1 desta tese.

Fish and Shellfish Immunology 86 (2019) 82–92



Contents lists available at ScienceDirect

Fish and Shellfish Immunology

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

Full length article

Litopenaeus vannamei stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections

Natanael Dantas Farias^{a,1}, Marcelo Falchetti^{a,1}, Gabriel Machado Matos^a, Paulina Schmitt^b, Cairé Barreto^a, Nicolas Argenta^a, Jean-Luc Rolland^c, Evelyne Bachère^c, Luciane Maria Perazzolo^a, Rafael Diego Rosa^{a,*}

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

^bLaboratório de Genética e Imunologia Molecular, Instituto de Biologia, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2373223, Valparaíso, Chile

^cInteractions Hôte-Pathogène-Environnement, Université de Montpellier, CNRS, France, Université de Perpignan Via Domitia, 34090 Montpellier Cedex 5, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Crustaceans
Penaeid shrimp
Invertebrate immunity
Antimicrobial peptide
Host defense peptide
Molecular diversity

ABSTRACT

Stylicins are anionic antimicrobial host defense peptides (AAMPs) composed of a proline-rich N-terminal region and a C-terminal portion containing 13 conserved cysteine residues. Here, we have increased our knowledge about these unexplored crustacean AAMPs by the characterization of novel stylicin members in the most cultivated penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei*. We showed that the *L. vannamei* stylicin family is composed of two members (*Lvan-Stylicin1* and *Lvan-Stylicin2*) encoded by different loci which vary in gene copy number. Unlike the other three gene-encoded antimicrobial peptide families from penaeid shrimp, the expression of *Lvan-Stylicins* is not restricted to hemocytes. Indeed, they are also produced by the columnar epithelial cells lining the midgut and its anterior caecum. Interestingly, *Lvan-Stylicins* are simultaneously transcribed at different transcriptional levels in a single shrimp and are differentially modulated in hemocytes after infections. While the expression of both genes showed to be responsive to damage-associated molecular patterns, only *Lvan-Stylicin2* was induced after a *Vibrio* infection. Besides, *Lvan-Stylicin2* also showed a distinct pattern of gene expression in the three portions of the midgut (anterior, middle and posterior) and during shrimp development. We provide here the first evidence of the diversity of the stylicin antimicrobial peptide family in terms of sequence and gene expression distribution and regulation.

1. Introduction

Antimicrobial host defense peptides (AMPs) are important components of the innate immune system of both vertebrates and invertebrates. They are usually described as gene-encoded peptides (less than 10 kDa) with cationic and amphipathic properties which selectively target the negatively charged membranes of microbes [1]. In addition to those classical cationic antimicrobial peptides (also known as CAMPs), the current classification of AMPs also includes polypeptides/proteins larger than 10 kDa, AMPs generated by the processing of precursor molecules and anionic peptides [2]. Anionic antimicrobial peptides (AAMPs) comprise a non-phylogenetic group of either gene-encoded or non-ribosomally synthesized molecules with a high proportion of anionic amino acid residues (aspartate and glutamate). AAMPs are widely distributed in living organisms and play an

important role in host defense against bacteria, fungi and viruses [3]. Like their cationic counterparts, AAMPs are multifunctional molecules engaged in different biological and immunological processes beyond antimicrobial functions [3].

Shrimp farming is an important economic activity for many developing countries in Asia and Latin America, which has been repeatedly threatened by infections caused by viruses and pathogenic bacteria from the genus *Vibrio*. Consequently, infectious disease outbreaks are clearly a major concern in aquaculture that has encouraged extensive research efforts. The scientific findings in the last decade have provided valuable information on the role of AMPs in shrimp defenses. More than natural antibiotics, shrimp AMPs are also involved in the control of the natural microbiota, wound healing, bacterial clearance and other immunomodulatory functions [4]. To date, four gene-encoded AMP families have been identified in the hemocytes of penaeid shrimp:

* Corresponding author.

E-mail address: rafael.d.rosa@ufsc.br (R.D. Rosa).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.021>

Received 30 August 2018; Received in revised form 24 October 2018; Accepted 7 November 2018

Available online 13 November 2018

1050-4648/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO 2 – Artigo científico produzido em coautoria durante o período de doutorado.

Fish and Shellfish Immunology 97 (2020) 294–299



Contents lists available at ScienceDirect

Fish and Shellfish Immunology

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

Full length article

A Type IIa crustin from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (crusFpau) is constitutively synthesized and stored by specific granule-containing hemocyte subpopulations



Paula Terra Bandeira^{a,1}, Javier Vernal^{b,2}, Gabriel Machado Matos^a, Natanael Dantas Farias^a, Hernán Terenzi^b, Aguinaldo Roberto Pinto^c, Margherita Anna Barracco^a, Rafael Diego Rosa^{a,*}

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

^b Center for Structural Molecular Biology, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^c Laboratory of Applied Immunology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Crustaceans
Invertebrate immunity
Host defense peptide (HDP)
Whey acidic protein (WAP) domain

ABSTRACT

Crustins are cysteine-rich antimicrobial peptides (AMPs) widely distributed across crustaceans. From the four described crustin Types (I to IV), crustins from the subtype IIa are the most abundant and diverse members found in penaeid shrimp. Despite the critical role of Type IIa crustins in shrimp antimicrobial defenses, there is still limited information about their synthesis and antimicrobial properties. Here, we report the subcellular localization and the antibacterial spectrum of crusFpau, a Type IIa crustin from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. The recombinantly expressed crusFpau showed antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria at low concentrations. Results from immunofluorescence using anti-crusFpau antiserum revealed that crusFpau is synthesized and stored by both granular and semigranular hemocytes, but not by hyaline cells. Interestingly, not all granular and semigranular hemocytes stained for crusFpau, revealing that this crustin is produced by specific granule-containing hemocyte subpopulations. Finally, we showed that the granule-stored peptides are not constitutively secreted into the plasma of healthy animals.

1. Introduction

Along with insects, crustaceans belong to the monophyletic clade Pancrustacea that is the most dominant animal group on the planet in terms of species number and biomass. Crustaceans occur in diverse habitats from terrestrial to aquatic and marine systems where they are constantly interacting with a wide range of microorganisms. However, unlike jawed vertebrates, they are devoid of a lymphocyte-based adaptive immune system and rely only on innate immune responses. The crustacean immune system is based on both antimicrobial and antiviral defenses mediated by hemocytes, the circulating immunocompetent cells [1]. Hemocytes are the main actors of the cellular defenses and play a key role in the phagocytosis and nodulation/encapsulation of invading microorganisms, but also in the production of

effector molecules, such as antimicrobial peptides [2].

Antimicrobial peptides (AMPs) provide the first line of host defense in crustaceans by acting as natural antibiotics mainly against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast and filamentous fungi. Of the different known crustaceans AMPs (for review see Ref. [3]), crustins are by far the largest and more diverse AMP family. Indeed, they are widely found among crustaceans and even in some hymenopteran insects [4]. Crustins are generally cationic peptides/polypeptides (7–22 kDa) containing twelve conserved cysteine residues, eight of them comprising a typical whey acidic protein (WAP) domain [5]. This WAP domain, which is also found in other protein families from both vertebrates and invertebrates [6], is a conserved motif forming a four-disulfide core (4DSC) arrangement at the C-terminus that exhibits anti-protease properties [7].

* Corresponding author.

E-mail address: rafael.d.rosa@ufsc.br (R.D. Rosa).

¹ Present address: Laboratory of Cellular Ultrastructure Hertha Meyer, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Present address: Interdisciplinary Postgraduate Program in Human Sciences, Center of Philosophy and Human Sciences, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.055>

Received 8 October 2019; Received in revised form 13 December 2019; Accepted 18 December 2019

Available online 18 December 2019

1050-4648/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Article

Massive Gene Expansion and Sequence Diversification Is Associated with Diverse Tissue Distribution, Regulation and Antimicrobial Properties of Anti-Lipopolysaccharide Factors in Shrimp

Gabriel Machado Matos¹, Paulina Schmitt², Cairé Barreto¹, Natanael Dantas Farias¹, Guilherme Toledo-Silva³, Fanny Guzmán⁴, Delphine Destoumieux-Garzón⁵, Luciane Maria Perazzolo¹ and Rafael Diego Rosa^{1,*}

¹ Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis SC 88040-900, Brazil;

gabrielmatos92@gmail.com (G.M.M.); cairebarreto@gmail.com (C.B.); natan.cbio@gmail.com (N.D.F.); lm.perazzolo@ufsc.br (L.M.P.)

² Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso 2373223, Chile; paulina.schmitt@pucv.cl

³ Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis SC 88040-900, Brazil; guilherme.toledo@ufsc.br

⁴ Núcleo Biotecnología Curauma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso 2373223, Chile; fanny.guzman@pucv.cl

⁵ Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia, CEDEX 5, 34090 Montpellier, France; Delphine.Destoumieux.Garzon@ifremer.fr

* Correspondence: rafael.d.rosa@ufsc.br; Tel: +55-48-37216163

Received: 15 September 2018; Accepted: 9 October 2018; Published: 11 October 2018



Abstract: Anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) are antimicrobial peptides with a central β -hairpin structure able to bind to microbial components. Mining sequence databases for ALFs allowed us to show the remarkable diversity of ALF sequences in shrimp. We found at least seven members of the ALF family (Groups A to G), including two novel Groups (F and G), all of which are encoded by different loci with conserved gene organization. Phylogenetic analyses revealed that gene expansion and subsequent diversification of the ALF family occurred in crustaceans before shrimp speciation occurred. The transcriptional profile of ALFs was compared in terms of tissue distribution, response to two pathogens and during shrimp development in *Litopenaeus vannamei*, the most cultivated species. ALFs were found to be constitutively expressed in hemocytes and to respond differently to tissue damage. While synthetic β -hairpins of Groups E and G displayed both antibacterial and antifungal activities, no activity was recorded for Group F β -hairpins. Altogether, our results showed that ALFs form a family of shrimp AMPs that has been the subject of intense diversification. The different genes differ in terms of tissue expression, regulation and function. These data strongly suggest that multiple selection pressures have led to functional diversification of ALFs in shrimp.

Keywords: host defense peptide; antimicrobial peptide; anti-LPS factor; host-microbe relationship; functional diversity; invertebrate immunity; crustacean; antimicrobial activity

1. Introduction

Anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) are multifunctional antimicrobial host defense peptides (AMPs) with the ability to bind to microbial surface molecules. They were initially characterized as