

Luiz Otávio de Barros Vilas Bôas

**ESTUDOS *IN SILICO* E *IN VITRO* DA HISTONA H2B
DE *Litopenaeus vannahmei* (BOONE, 1931).**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do grau
de Licenciado em Ciências Biológicas.
Orientador: Prof. Dr. Guilherme
Razzera Maciel
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria
Risoleta Freire Marques

Florianópolis
2018

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

Vilas Bôas, Luiz Otávio de Barros
Estudos in silico e in vitro da histona h2b de
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931). / Luiz Otávio
de Barros Vilas Bôas ; orientador, Guilherme
Razzer, coorientadora, Maria Risoleta Freire
Marques, 2018.
51 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. H2B. 3. Peptídeo
antimicrobiano. 4. Dicroísmo circular. 5. Camarão
branco. I. Razzer, Guilherme. II. Marques, Maria
Risoleta Freire. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Luiz Otávio de Barros Vilas Bôas

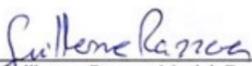
**ESTUDOS *IN SILICO* E *IN VITRO* DA HISTONA H2B
DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931).**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção do Grau de “Licenciado” e aprovado em sua forma final pelo
Centro de Ciências Biológicas - CCB

Florianópolis, 27 de novembro de 2018.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.
Coordenador do Curso

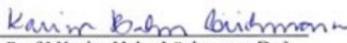
Banca Examinadora:



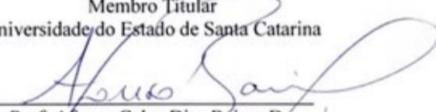
Prof. Guilherme Razzera Maciel, Dr.
Presidente da banca - Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



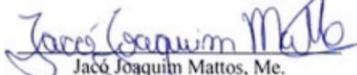
Prof.ª Maria Risoleta Freire Marques, Dr.ª
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.ª Karim Hahn Lüchmann, Dr.ª
Membro Titular
Universidade do Estado de Santa Catarina



Prof. Afonso Celso Dias Baiúny, Dr.
Membro Titular
Universidade Federal de Santa Catarina



Jacó Joaquim Mattos, Me.
Membro Suplente
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a todas e todos
que se fizeram presentes em minha vida
de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, enfatizo meus mais profundos agradecimentos à minha família, a qual jamais me deixou sem suporte ou incentivo para batalhar na realização dos meus objetivos. Por estar sempre por perto, mesmo quando longe, para me dar todo tipo de apoio. Sem ela, eu literalmente não estaria aqui.

Agradeço fortemente a Universidade Federal de Santa Catarina e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, por tornarem possível todo o aprendizado adquirido e a produção deste trabalho.

Ao meu orientador Guilherme Razzera, pelo grande voto de confiança inicial e suporte durante esses anos de graduação.

Ao Jacó, por ser sempre atencioso e prestativo sem medir esforços.

Aos professores Maria Risoleta e Afonso também pelo suporte, direto e indireto.

À Flávia pelas excelentes correções e sugestões para este texto, sem as quais este trabalho estaria muito longe do aceitável.

Aos demais integrantes do LABCAI, Daina, Bárbara Righetti e Clei, pela ajuda na elaboração deste trabalho. Vera, Ísis, Camila, Vanessa, Juliana, Tomas, Gabriel, Karla, Cecília, Laura, Diego, Ana Paula, Gabrielle, Matheus e Bárbara Othero, pela companhia e companheirismo em situações diversas e adversas.

Ao professor Admir e à Ana Carolina por compartilharem comigo os conhecimentos relacionados aos testes antimicrobianos.

Ao professor Hernan e a TAE Vanessa pela disponibilização e auxílio na utilização do espectropolarímetro de dicroísmo circular.

Aos meus amigos e colegas de farra, de graduação, de moradia, a todos que se fizeram presentes em minha vida de alguma forma, um grande obrigado.

O real sentido da vida, é que ela não tem sentido.
Somos apenas um algoritmo bioquímico que, por
acaso, perdura.
(O autor, 2018)

RESUMO

O camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* tem sido um grande alvo de estudos devido a seu valor econômico no panorama da aquicultura mundial. A ocorrência de enfermidades em cultivos de *L. vannamei* tem causado grandes prejuízos à carcinicultura, uma vez que alguns patógenos são altamente letais e se alastram com grande facilidade, como o vírus da mancha branca (WSSV) ou bactérias *Vibrio* spp. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, a proteína Histona H2B tem se mostrado responsiva em estudos transcricionais e proteômicos, após infecções naturais e experimentais em *L. vannamei*. Nesse sentido, análises *in silico* e *in vitro* dessa proteína foram realizadas, com o objetivo de gerar informações relacionadas à sua estrutura e ao seu potencial papel antimicrobiano e esclarecer os processos de defesa de *L. vannamei*. Para isso, foram realizadas análises de caracterização da estrutura, clonagem, expressão, purificação e testes antimicrobianos com a proteína H2B recombinante (H2Br) e de um peptídeo N-terminal sintético dela derivado, região promissora para atividade antimicrobiana. A proteína foi clonada, expressa, purificada e reenovelada. H2Br e o peptídeo sintético apresentaram estruturação secundária, como observado através de dicroísmo circular, e o segundo, apenas sob condições hidrofóbicas. Ambos foram capazes de inibir parcialmente o crescimento de bactérias *V. parahaemolyticus in vitro*. Possivelmente, a região N-terminal da proteína H2B é um dos peptídeos gerados durante a clivagem por proteinases de membrana sendo parte integrante da atividade antimicrobiana relatada para a proteína inteira.

Palavras-chave: H2B. Camarão branco. Dicroísmo circular. Peptídeo antimicrobiano.

ABSTRACT

The pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* has been a major target for studies due to its economic value for aquaculture worldwide. Diseases in cultivated *L. vannamei* have caused great loss to shrimp farming, since some pathogens are highly lethal and can spread easily, such as White Spot Syndrome Virus (WSSV) and bacteria *Vibrio* spp. Previous studies by our group have shown that Histone H2B protein is responsive in transcriptional and proteomic studies after either natural or experimental infections in *L. vannamei*. In the present study, *in silico* and *in vitro* analyzes of this protein were carried out, with the objective of generating information related to H2B structure and potential antimicrobial role in order to clarify the defense processes of *L. vannamei*. Therefore, structure analysis, cloning, expression, purification and antimicrobial tests were performed with the recombinant H2B protein (H2Br) and with a synthetic N-terminal peptide, a region of promising potential of antimicrobial activity. H2B was cloned, expressed, purified and refolded. H2Br and the synthetic peptide showed secondary structure as revealed by circular dichroism, but the latter, only under hydrophobic conditions. Both were able to partially inhibit the growth of *V. parahaemolyticus* bacteria *in vitro*. We suggest that the N-terminal region of the protein is one of the peptides generated during cleavage by membrane proteinases and that it takes part in the antimicrobial activity reported for the whole protein.

Keywords: H2B. White Shrimp. Circular Dichroism. Antimicrobial Peptide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alinhamento de sequências de H2B de *Litopenaeus vannamei*, *Drosophila melanogaster*, *Crassostrea gigas* e *Homo sapiens* realizado com MUSTANG (KONAGURTHU et al., 2006). A porção N-terminal (1-31), possivelmente gerada na clivagem pela OMP-T, está destacada em vermelho, também correspondendo ao peptídeo sintetizado para estudo. Os valores de identidade da sequência completa e da porção N-terminal (quadro cinza) estão identificados ao final das sequências. Resíduos preservados marcados pelo asterisco (*) abaixo da coluna. 32

Figura 2 – Modelo em *cartoon* da proteína H2B de *L. vannamei* utilizando a ferramenta SWISS-MODEL. As regiões N e C-terminal estão demarcadas na figura. Regiões de alto grau de identidade e modeladas com sucesso estão representadas pela cor azul; regiões diferentes do *template* e sem estruturação predita estão representadas na cor laranja. 33

Figura 3 – Modelos da porção N-terminal de H2B de *Litopenaeus vannamei* e outros organismos. A: modelo para o camarão *L. vannamei* mostrando dois segmentos em hélice correspondendo a 25 e 16 % do peptídeo. B: Modelos para outras espécies, *Drosophila melanogaster* (mosca), *Crassostrea gigas* (ostra) e *Homo sapiens* (humano), mostrando também a formação de hélices. C: Estrutura de *L. vannamei*, mostrando os aminoácidos carregados positivamente (K11, K15 e K22), em azul, formando uma superfície estruturada nas α -hélices. 34

Figura 4 – Gel de agarose para separação dos fragmentos, clivados pelas enzimas de restrição NdeI e BAMHI referentes ao gene clonado da H2B recombinante de *L. vannamei*. 1 a 5: Vetores clivados, fragmentos com o gene entre 300 e 400 pb. 6: Controle contendo vetor não clivado, demonstrando os dois padrões de envelhecimento de plasmídeos. 35

Figura 5 – SDS-PAGE dos produtos da expressão, purificação e reenovelamento da proteína H2B recombinante (H2Br) de *Litopenaeus vannamei*. A: 1, extrato bruto de *E. coli* BL21 após 3 h de expressão. 2, sobrenadante da primeira centrifugação após lise celular por sonicação. B: 3, fração sem interação com a coluna *HisTrap*. 4, pico 2: 5 a 8, frações de 1 ml referentes ao pico de eluição (pico 4), entre 21 e 25 ml de volume de eluição. C: 9, H2Br dialisada em tampão sem ureia. 10, controle com H2Br purificada em tampão com ureia. 36

Figura 6 – Cromatograma de purificação da proteína H2Br em FPLC. 1: Material presente no extrato não reagente com a coluna *HisTrap*. 2 e 3: Pequenos picos de absorbância durante a lavagem da coluna. 4: Pico único de eluição da coluna com início a ~150 mM de imidazol. 37

Figura 7 - Espectro de dicroísmo circular (CD) de 3 μ M H2Br em 10 mM fosfato pH 7,0, com intervalo de 200 a 270 nm, mostrando picos negativos a 208 e 222 nm (linha preta). Proteína a 80 ° C (linha verde) e a 15 ° C, pós-desnaturação, (tracejado)..... 38

Figura 8 - Espectro de dicroísmo circular (CD) do peptídeo N-terminal da H2B de *Litopenaeus vannamei*: 35 μ M em 5 mM fosfato pH 7,0 (linha preta), e em 20 mM SDS, 5 mM fosfato pH 7,0 (linha verde)..... 39

Figura 9 – Teste de atividade antimicrobiana da histona H2B de *L. vannamei* recombinante contra *V. parahaemolyticus*. Gráfico de densidade ótica dos picos obtidos em 9 h de incubação. 40

Figura 10 – Avaliação por SDS-PAGE do processo de clivagem por trombina da *HisTag* ligada à H2Br. Tempos de hidrólise: 0, 1, 2, 3 h e *overnight*, a 4 °C, representados respectivamente em 1, 2, 3, 4 e 5. 42

Figura 11 - Teste de atividade antimicrobiana do peptídeo N-terminal da histona H2B de *L. vannamei* contra *V. parahaemolyticus*. A: Curvas de crescimento relativas a 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 μ M final do peptídeo com densidade ótica máxima (pico) obtida em 7h30m de incubação. As curvas possuem a mesma taxa exponencial de crescimento ($p < 0,05$). B: Gráfico de barras dos picos referentes às diluições do peptídeo, * indica diferença estatística ($p < 0,05$). 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ° C – Graus Celcius
- µl – Microlitro
- µM – Micro molar
- µm – Micrômetro
- AMP – *Antimicrobial Peptides*
- CD – *Circular Dichroism*
- Da – Daltons
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DO – Densidade Ótica
- ET – *Extracellular Traps*
- FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*
- HisTag – Cauda de histidina
- IPTG – Isopropil-β-D-tiogalactopiranosideo
- kDa – Quilo Daltons
- LB – Luria Bertani
- mm – Milímetro
- NaCl – Cloreto de Sódio
- ng – Nano grama
- nm – Nanômetro
- OMP-T – *Outher Membrane Proteinase-T*
- pb – Pares de base
- PI – Ponto Isoelétrico
- PM – Peso Molecular
- RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro
- SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*
- SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
- TCBS-Agar – *Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar*
- TSB – *Tryptic Soy Broth*
- UFC – Unidade Formadora de Colônia
- WSD – *White Spot Disease*
- WSSV – *White Spot Syndrome Virus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	PATÓGENOS E RESPOSTAS DE DEFESA EM INVERTEBRADOS.....	21
1.2	MEMBRANA CELULAR BACTERIANA E PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	22
1.3	HISTONAS COMO UMA FORMA DE DEFESA	23
1.4	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	24
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo geral.....	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQUÊNCIA DA H2B.....	26
3.2	CONSTRUÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO E DOS MODELOS 3D.....	26
3.3	CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO.....	27
3.4	TRANSFORMAÇÃO E EXPRESSÃO DA HISTONA RECOMBINANTE	27
3.5	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	28
3.6	REENOVELAMENTO E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	28
3.7	DICROISMO CIRCULAR	29
3.8	TESTES ANTIMICROBIANOS	29
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	ANÁLISES <i>IN-SILICO</i> DA SEQUÊNCIA DA H2B	31
4.1.1	Parâmetros moleculares e alinhamento de sequências	31
4.1.2	Modelagens 3D: Proteína completa e região N-terminal.	33
4.2	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA H2B RECOMBINANTE.....	35
4.3	DICROÍSMO CIRCULAR DA H2BR E DO PEPTÍDEO N-TERMINAL.....	38

4.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA H2BR CONTRA <i>Víbrio parahaemolyticus</i>	40
4.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO N-TERMINAL DA H2B CONTRA <i>V. parahaemolyticus</i>	42
5	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 PATÓGENOS E RESPOSTAS DE DEFESA EM INVERTEBRADOS

Os processos de defesa imune de invertebrados têm atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa ao longo dos anos. Em particular, os invertebrados aquáticos, por viverem na água, estão expostos e/ou vulneráveis a diferentes fontes e formas de agentes infecciosos. Em virtude disso, foram selecionados com os mais variados mecanismos de defesa. Ainda que sejam organismos relativamente menos complexos, e mesmo com um sistema de defesa bastante rudimentar em comparação com gnatostomados, esses organismos são capazes de desvencilhar-se de situações patogênicas de forma bastante eficiente (SCHULENBURG; BOEHNISCH; MICHIELS, 2007; SPERSTAD et al., 2011). É conhecido que os invertebrados não possuem resposta imune adaptativa, no entanto, apresentam um tipo de memória imunológica (ROWLEY; POWELL, 2007).

O camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* tem sido um grande alvo de estudos, principalmente devido a sua importância econômica em diferentes regiões do Brasil e do mundo. A ocorrência de doenças em cultivos de *L. vannamei* tem causado grandes prejuízos aos aquicultores, uma vez que alguns patógenos são altamente letais e se alastram com grande facilidade, como exemplo temos o vírus da mancha branca WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) capaz de dizimar 100% do cultivo em apenas 3 a 7 dias de infecção (RAMOS-CARREÑO et al., 2014), e diversas bactérias, com destaque para *Vibrio* spp, que acometem os cultivos com frequência (AUSTIN, 2010). Estudos realizados com *Vibrio parahaemolyticus* mostraram que essa bactéria é capaz de infectar camarões saudáveis, ou camarões já debilitados por outras enfermidades (como a síndrome da mancha branca, WSD), de forma oportunista (ZHANG, XIAOJING; SONG; HUANG, 2016).

Os peneídeos possuem diversas formas de defesa contra patógenos já conhecidas, como as mediadas por hemócitos em suspensão na hemolinfa, responsáveis em fagocitar invasores, liberar enzimas oxidativas, gerar melanização, dentre outras funções; e a resposta imune humoral, inata, que conta com proteínas de reconhecimento de padrão e desencadeiam a liberação de agentes imunes na hemolinfa, proteínas lisossomais e peptídeos antimicrobianos (AGUIRRE GUZMAN et al., 2009).

Um mecanismo de defesa imunológica identificado recentemente é a armadilha extracelular (*extracellular traps* - ET). Este mecanismo já foi descrito em vertebrados (BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2012) e invertebrados, como *Crassostrea gigas* (POIRIER et al., 2014) e *L. vannamei* (NG et al., 2013). As células de defesa desses animais adotam como último recurso o processo de etose, em que a membrana celular e nuclear é rompida e o genoma é liberado sobre o organismo invasor, prendendo-o em uma “rede” de cromatina. Esta armadilha tem caráter catiônico, e interage fortemente com a membrana do invasor, podendo modificá-la ou rompê-la (HALVERSON et al., 2015). Dentre as proteínas componentes das ET, as histonas têm demonstrado um importante papel como agentes antimicrobianos. O estudo dos mecanismos de ação que envolvem essa proteína podem, portanto, contribuir para o entendimento deste processo de defesa em invertebrados.

1.2 MEMBRANA CELULAR BACTERIANA E PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Bactérias gram-negativas e gram-positivas têm como principal caráter de classificação a diferença no seu envelope celular. As gram-positivas possuem parede celular de peptidoglicano muito mais espessa quando comparada às gram-negativas, que por sua vez, possuem uma membrana extra externa à parede celular (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). Ambos grupos de bactérias possuem mecanismos de defesa contra o ambiente externo, como as enzimas proteases extracelulares. Estas proteases em gram-negativas estão inseridas na membrana externa, e agem clivando diferentes proteínas que possuam seu sítio de clivagem correspondente. Em gram-positivas, as proteínas extracelulares ficam permeadas na parede celular ou presas na membrana interna (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010). A mais conhecida e abundante das proteases de bactérias gram-negativas é a protease-T de membrana externa (*Outer Membrane Proteinase-T* – OMP-T), que cliva proteínas em sítios com sequências de resíduos carregados positivamente, prioritariamente com arginina em P1 e P1' (MCCARTER et al., 2004). Entretanto, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos de ação que envolvem essas proteases.

Uma categoria de agentes imune eficientes contra membrana celular bacteriana e muito explorada em pesquisas envolvendo imunidade de invertebrados aquáticos é a dos Peptídeos Antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides* – AMP). Estes peptídeos estão presentes em vertebrados e invertebrados, e possuem relevância na ação imunológica

dos organismos em questão (OTERO-GONZÁLEZ et al., 2010). Os AMP podem ser gerados diretamente por tradução de RNAm codificante, ou indiretamente por meio de clivagens de proteínas destinadas a outras funções, como no caso das histonas, envolvidas diretamente no enovelamento do DNA em eucariotos e algumas *Archaea*. Como características principais, os peptídeos antimicrobianos possuem em sua composição elevado número de aminoácidos catiônicos, como lisina e arginina, assim como aminoácidos de caráter hidrofóbico. Esses podem apresentar estruturação cíclica ou irregular, no caso dos menores (~14 resíduos) (WIMLEY, 2010). Sugere-se que essas moléculas possuam mecanismos de ação envolvendo interação com a membrana do patógeno por abertura de poros para entrada e saída de compostos e/ou permeando a membrana e interagindo com componentes vitais intracelulares (HENRIQUES; MELO; CASTANHO, 2006). Há indícios de que a afinidade desses peptídeos pela membrana celular bacteriana seja tão intensa, que a diferença de concentração entre peptídeos interagindo com a membrana celular bacteriana e os que estão em suspensão na fase aquosa seja 10.000 vezes maior (MELO; FERRE; CASTANHO, 2009).

1.3 HISTONAS COMO UMA FORMA DE DEFESA

As histonas extranucleares, ao entrarem em contato com a membrana celular do patógeno, podem gerar alguns AMP a partir da sua clivagem, possivelmente por um ou mais tipos de proteínas membranares, como a OMP-T (KAWASAKI et al., 2008). Em hemócitos de *L. vannamei*, constata-se também um elevado número de histonas extranucleares demonstrando potenciais antimicrobianos bastante expressivos. Alguns patógenos podem ter o seu desenvolvimento completamente inibido por meio de ações bioquímicas agindo em conjunto, ou não, com as ações mecânicas anteriormente descritas (NG et al., 2013; PATAT et al., 2004). A atividade antimicrobiana de histonas também foi detectada em meio extracelular, como no trato reprodutivo de vacas (DRÁB et al., 2014), plasma de lagostins (LEE; LEE; SÖDERHÄLL, 2003) secreções da pele de sapo (KAWASAKI et al., 2008), bem como em eosinófilos (YOUSEFI et al., 2008), e nesses casos, também demonstrou significativa ação inibitória contra diferentes organismos possivelmente patogênicos, como *Escherichia coli* (KAWASAKI et al., 2008). Estudos anteriores do nosso grupo demonstram níveis de transcrição significativamente elevados de alguns genes, como o gene da H2B, em infecções por WSSV em *L. vannamei* quando comparados a um grupo controle não infectado (GONÇALVES-

SOARES et al., 2012; MÜLLER, 2009), bem como em relação ao nível de expressão da proteína (VALENTIM-NETO; FRAGA; MARQUES, 2014). Uma vez que não se sabe ao certo o mecanismo bioquímico responsável pela atividade antimicrobiana da H2B, revelar informações estruturais dessa proteína é fundamental. Restam perguntas, tais como: Quais regiões são responsáveis pela atividade? Qual parte interage com a membrana? Entende-se que para a compreensão de suas características *in vivo* e *in vitro*, faz-se necessária uma análise *in silico* das sequências de H2B, a produção recombinante desta molécula e a sua caracterização estrutural e funcional.

1.4 ANÁLISES *IN SILICO*

Apoiar-se em análises *in silico* tem se mostrado crucial no bom desenvolvimento de pesquisas científicas. Diversas ferramentas são desenvolvidas e aprimoradas constantemente, com as mais diversas funções, para facilitar o acesso ou identificar informações biológicas. Os estudos *in silico* podem gerar evidências promissoras para testes *in vitro*, assim como a recíproca é verdadeira, podendo identificar mecanismos ou fenômenos evidenciados *in vitro* após análises *in silico* mais direcionadas. Com base em dados bioquímicos já estabelecidos, é possível, por exemplo, caracterizar informações físico-químicas de uma sequência de aminoácidos de forma fácil e rápida, como é feito pela ferramenta Expasy ProtParam. Estes dados são um diferencial para o bom andamento das atividades experimentais, uma vez que indicam o pH ideal para utilização em soluções, formas de armazenamento ideal das proteínas em teste e uma série de outras situações. Além disso, modelagens 3D realizadas de forma comparativa como as realizadas pelo SWISS-MODEL (ARNOLD et al., 2006) ou I-Tasser (ZHANG, Yang, 2008) auxiliam no cruzamento de dados, permitindo realizar inferências para proteínas com alto grau de homologia, como mecanismos de ação e/ou interação em potencial. Situação parecida com a obtida por meio de alinhamentos de sequências, como os construídos pela ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004), permitindo evidenciar sequências e resíduos conservados de possível ação específica; também estimar a estruturação secundária da proteína; avaliar a preservação de sítios catalíticos no caso de enzimas e outras informações relevantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar a histona H2B de *Litopenaeus vannamei* por meio de análises *in silico* e *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Expressar de forma heteróloga a H2B recombinante (H2Br);
- Purificar a H2Br;
- Caracterizar estruturalmente a proteína H2B de *L. vannamei* e sua porção N-terminal;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da H2Br, e de um peptídeo da região N-terminal, *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE *IN SILICO* DA SEQUÊNCIA DA H2B

A sequência de aminoácidos da proteína H2B de *L. vannamei* P83863.2, obtida do banco de dados Uniprot, única sequência descrita para a espécie segundo nossas buscas, foi alinhada com outras sequências homólogas, provenientes de outras espécies, utilizando a ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004). As sequências selecionadas para o alinhamento foram de: *Drosophila melanogaster* (Artrópode), *Crassostrea gigas* (Invertebrado) e *Homo sapiens* (Vertebrado). Estas sequências de estrutura primária foram selecionadas do banco de dados *Genbank* em função de sua disponibilidade e no grau de similaridade entre as espécies. Foram considerados critérios como proximidade evolutiva (de mesma família a reinos diferentes) e similaridade entre as sequências. Também foram levadas em consideração sequências de H2B com atividade antimicrobiana já relatada na literatura (BACHÈRE et al., 2004). Avaliações referentes à estrutura primária e secundária da proteína foram realizadas com o *software* PSIPred (JONES, 1999) para estimativas das possíveis áreas de efeito da propriedade antimicrobiana. Este programa permitiu fazer inferências sobre resíduos catiônicos expostos na superfície, demonstrando regiões carregadas e de possível importância para a atividade a ser avaliada. Também para fins de caracterização *in silico*, a ferramenta ExPASy ProtParam Tool foi utilizada para a obtenção de dados como ponto isoelétrico (PI), coeficiente de extinção, índice de instabilidade e índice alifático.

3.2 CONSTRUÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO E DOS MODELOS 3D

Baseando-se na sequência de maior potencial antimicrobiano da proteína, um peptídeo sintético N-terminal (sequência 1-31) foi construído (*GenOne Biotechnologies*) para posteriores análises *in vitro*. Características como número de cargas positivas ou resíduos hidrofóbicos foram consideradas na escolha da região da proteína em questão a ser sintetizada. Também consideramos os possíveis sítios de clivagem por OMP-T na proteína, com a finalidade de mimetizar o processo que possivelmente gera os peptídeos antimicrobianos em situações de interação com bactérias gram-negativas.

O modelo da Histona H2B de camarão foi gerado por meio de modelagem comparativa, utilizando uma sequência de H2B humana

como molde, disponível na rede, na plataforma SWISS-MODEL (ARNOLD et al., 2006). A qualidade foi acessada através de parâmetros como QMEAN e *procheck*. Já o peptídeo N-terminal foi submetido a modelagem por fragmentos na plataforma I-Tasser (ZHANG, Yang, 2008) nos parâmetros padrão. A qualidade foi acessada através do C-score e TM-score.

3.3 CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

A sequência da proteína foi enviada para construção de um vetor sintético de clonagem (*IDT DNA technologies*), com otimização de códons para expressão bacteriana. O vetor foi construído com a adição de sítios de clivagem para as enzimas NdeI e BamHI. O fragmento clonado foi digerido com as enzimas de restrição e incorporado em vetor de expressão heteróloga pET-14b (*Novagen*) também previamente digerido com as citadas enzimas. Este vetor inclui, na porção N-terminal da proteína recombinante, uma cauda de histidinas (*HisTag*) para posterior purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (*HisTrap*). A retirada desta cauda de histidinas é possibilitada pela inserção em conjunto de um sítio de clivagem para a enzima trombina entre a *HisTag* e a proteína recombinante. A ligação por T4 DNA ligase (Fermentas) entre fragmentos e pET-14b foi realizada a 4 ° C durante 16 h conforme as recomendações do fabricante. Foi utilizada a cepa de *E. coli* DH5 α para a multiplicação dos plasmídeos pET-14b + H2B. Os plasmídeos multiplicados foram extraídos utilizando o protocolo para extração de DNA plasmidial *miniprep*.

3.4 TRANSFORMAÇÃO E EXPRESSÃO DA HISTONA RECOMBINANTE

A cepa BL21 (DE3) pLYZS de *E. coli* foi transformada por *heatshock* com 2 ng do vetor clonado pET-14b + H2B em 50 μ l de cultura. Após incubação de 2 h, 37 ° C em agitação, a cultura de bactérias foi plaqueada em LB-Ágar, contendo ampicilina e cloranfenicol para seleção das unidades formadoras de colônia (UFCs). UFCs isoladas e aleatórias foram transferidas para meio líquido (LB-Broth), também suplementado com ampicilina e cloranfenicol, e mantidas em incubação *overnight* sob agitação como pré-inóculo. A cultura foi inoculada em um novo meio líquido e incubada também a 37 ° C em agitação, tendo seu processo de indução iniciado quando a densidade ótica, medida em 600 nm, atingiu 0,8. A indução foi realizada com a adição de isopropil- β -D-

tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM final. Após 3 h, os cultivos foram centrifugados a 3645 x g, por 15 min, 4 ° C para a obtenção dos *pellets* bacterianos.

3.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A proteína recombinante expressa (H2Br) foi extraída dos *pellets* bacterianos inicialmente por meio de etapas de lise celular. Os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lise, 50 mM Tris pH 8.0 e 500 mM NaCl, e homogeneizados por sonicação (34 % de amplitude por 10 min, com 30 seg de ativação e 30 seg de descanso). O extrato obtido foi centrifugado a 12000 x g, 20 min, e o sobrenadante foi descartado. O novo *pellet* foi ressuspensão em um segundo tampão de lise, 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M Ureia e 5 % Glicerol, e centrifugado, também a 12000 x g, 20 min. O novo sobrenadante foi coletado para purificação e o *pellet* final, descartado.

A purificação da proteína H2Br foi realizada por meio de cromatografia líquida de afinidade *Histrap*, com auxílio do equipamento AKTApurifier *fast protein liquid chromatography* (FPLC). Para o procedimento, a coluna em questão foi reequilibrada com “Solução A” (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M Ureia e 5 % Glicerol), e foi eluída, após a aplicação da amostra, em um gradiente ascendente de “Solução B” (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 6 M Ureia, 5 % Glicerol e 500 mM Imidazol), na faixa de 25 a 500mM. Amostras foram coletadas durante todo o processo de purificação para análise, principalmente durante a etapa de eluição, em alíquotas de 2 mL. Os produtos da purificação foram analisados por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) 15 %, em condições redutoras e desnaturantes, e corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*, para confirmação da fração referente à proteína H2Br e avaliação de sua relativa pureza. A quantificação do conteúdo proteico foi realizada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976) com albumina de soro bovino como padrão, e a leitura colorimétrica realizada em microplaca no espectrofluorímetro Spectramax (Molecular Devices).

3.6 REENOVAMENTO E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A fração referente ao pico de eluição da proteína H2Br, confirmado por SDS-PAGE, foi dialisada em tubo com membrana de celulose 0,22 µm em duas etapas para que a concentração final de imidazol e ureia

fossem reduzidas. A primeira etapa foi realizada em 1 L de tampão, 50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl e 30 % Glicerol, *overnight* em agitação. A segunda etapa foi semelhante a primeira, porém, com 50 % de glicerol no tampão de diálise. Alíquotas do segundo tampão de diálise foram coletadas antes e depois da diálise como controles para o teste antimicrobiano. A análise do produto pós-diálise também foi realizada por SDS-PAGE nas mesmas condições citadas no método anterior.

3.7 DICROISMO CIRCULAR

A proteína H2Br e o peptídeo N-terminal foram analisados por Dicroísmo Circular (*Circular Dichroism – CD*) a fim de avaliar o reenovelamento da proteína recombinante, e estruturação secundária de ambos. Estes experimentos de espectroscopia de CD foram realizados em um espectropolarímetro JASCO J-815 equipado com um controlador de temperatura, disponibilizado pelo CEBIME/UFSC. Espectros de CD foram obtidos em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. As leituras de espectros totais foram feitas em um intervalo de comprimento de onda variando de 250 a 190 nm, com 10 µM de proteína para H2Br e 35 µM para o peptídeo N-terminal. Os experimentos foram realizados com velocidade de varredura de 100 nm/min, resolução de 0,1 nm, resposta de 2 seg e largura de faixa de 1 nm. Em cada experimento, foram obtidos a média de 3 espectros. Os espectros de calibração (somente o tampão) foram subtraídos dos espectros das moléculas analisadas. Para H2Br foi utilizado 10 mM tampão fosfato pH 7,0 e 50 mM NaCl. Para o peptídeo, 5 mM fosfato pH 7,0, avaliado também na presença de 20 mM SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). A estabilidade estrutural da proteína purificada foi avaliada na faixa de temperatura de 15 a 80 ° C, com aumento gradual de temperatura. Os espectros obtidos para o peptídeo N-terminal foram analisados com o *software* CAPITO (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GÖRLACH, 2013), que utiliza picos a 222 nm e 200 nm para avaliar o grau de enovelamento.

3.8 TESTES ANTIMICROBIANOS

A H2Br e o peptídeo N-terminal foram testados contra cepa de *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), a qual foi cedida gentilmente à Prof^ª Maria Risoleta Freire Marques pelo Laboratório de Enterobactérias LABENT/IOC/Fiocruz. A cepa foi ativada inoculando 1 µl de cultura estoque em 600 µl de meio de cultura TSB (*Tryptic Soy Broth*) 3 % NaCl,

e incubada a 30 ° C por 2 h em agitação. 100 µl do pré-inóculo foi plaqueado em TCBS-Ágar (*Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar*) e mantido em incubação 30 ° C *overnight*. Colônias isoladas e identificadas como *V. parahaemolyticus* foram coletadas com auxílio de alça de platina, transferidas para solução salina autoclavada (Água MilliQ 3 % NaCl) e agitadas em *vortex* até adquirir caráter homogêneo. A turbidez da solução foi medida comparativamente até se igualar a 0,5 na escala McFarland.

As análises de atividade antimicrobiana foram feitas em placa de 96 poços por colorimetria (600 nm) em espectrofluorímetro Spectramax, com duração total de 10 h e incubação a 30 ° C, havendo leituras de densidade ótica intermitentes com intervalo de 15 min entre elas. Para todo o ensaio, foi utilizado uma proporção de duas unidades de meio de cultura Muller&Hinton para cada uma de solução a ser testada (2:1). As proteínas foram diluídas 1:1, de forma seriada, em seu respectivo tampão. Ao final, cada poço do experimento continha 100 µl de meio de cultura Muller&Hinton, 50 µl de solução a ser testada e 10 µl de solução salina com ou sem vibriões, para teste ou branco, respectivamente. H2Br foi testada nas concentrações 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 µM final. Em relação aos controles utilizados para a proteína inteira, a lisozima, proteína de atividade antimicrobiana conhecida, foi prepara em tampão pós-dialise 2 e diluída nas mesmas concentrações finais da H2Br, como controle positivo. Para possível verificação da influência de interferentes na atividade antimicrobiana das proteínas, o tampão para diálise 2 e pós-dialise 2 foram utilizados como controles negativos. Água ultrapura também foi utilizada como controle negativo. Cada uma das condições do experimento teve seu respectivo branco (solução salina sem vibriões) subtraído nos resultados finais. O peptídeo N-terminal foi testado nas concentrações 80; 40; 20; 10; 5 e 2,5 µM final, diluído em água ultrapura em um ensaio à parte. Todas as proteínas e controles foram analisados em triplicata, com exceção da Lisozima, em duplicata.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas do ensaio antimicrobiano, envolvendo o peptídeo N-terminal, foram realizadas no *software* Graphpad. As curvas de crescimento foram analisadas pelo modelo de regressão não linear, pela equação de crescimento exponencial. Os picos de crescimento foram plotados separadamente e a diferença entre os mesmos foi analisada por Kruskal-Wallis com pós teste de múltiplas comparações de Dunn.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES *IN-SILICO* DA SEQUÊNCIA DA H2B

4.1.1 Parâmetros moleculares e alinhamento de sequências

A sequência de 123 resíduos referente à proteína H2B de *L. vannamei*, quando analisada pela ferramenta ProtParam, demonstrou ter massa teórica de 13.668,92 Da (13,6 kDa). Com a adição da sequência de aminoácidos referente à cauda de histidina na região N-terminal, a proteína passa a ter o peso molecular teórico de 15,7 kDa. As análises também mostraram que 28/123 resíduos são de caráter positivo, sendo apenas 9 de caráter negativo, evidenciando um ponto isoelétrico teórico de 10,39, com variação insignificante após a inserção da *HisTag* na sequência. Este caráter positivo é esperado em histonas, uma vez que são proteínas extremamente conservadas evolutivamente e desempenham a função de ancoragem da molécula de DNA, de caráter negativo. Outro aspecto importante sobre proteínas positivamente carregadas, é o seu grande potencial antimicrobiano, podendo gerar peptídeos catiônicos após clivadas em algum processo bioquímico celular. Esta característica vai ao encontro a vários outros relatos de proteínas carregadas positivamente, que ao serem clivadas, geram peptídeos catiônicos com atividade antimicrobiana, como os descritos em invertebrados marinhos (OTERO-GONZÁLEZ et al., 2010; SPERSTAD et al., 2011), mais especificamente em crustáceos (ROSA; BARRACCO, 2010), assim como a própria proteína homóloga H2A (KOO et al., 2008). Em virtude do PI 10,39, optou-se por trabalhar com pH 8,0, na tentativa de diminuir a reatividade da proteína. Além de se estar levando em consideração também, um valor não muito distante do pH fisiológico dos camarões brancos do Pacífico (pH = 7,0) (DANIEL, 2014).

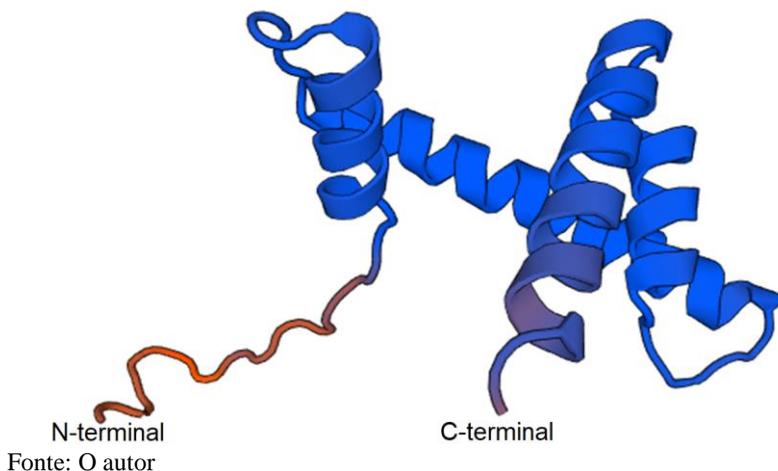
O índice de instabilidade, também avaliado pela mesma ferramenta, determinou uma pontuação de 45,19, classificando a proteína como instável. Proteínas com *score* acima de 40 nesta escala são classificadas como instáveis devido à presença de dipeptídeos que, estatisticamente, conferem maior chance de degradação a estas proteínas (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990).

Ao se analisar comparativamente o alinhamento de sequências de H2B, verificou-se que a proteína de *Litopenaeus vannamei* tem maior identidade com a de *Drosophila melanogaster* (96 %), possuindo também alto grau de identidade em relação às outras sequências analisadas (85 % *Crassostrea gigas* e 84 % *Homo sapiens*). A menor

4.1.2 Modelagens 3D: Proteína completa e região N-terminal

A sequência molde utilizada permitiu a modelagem 3D, representada por hélices em *cartoon*, de mais de 70 % da sequência da proteína completa, mantendo apenas a região N-terminal, referente à cauda da histona, não estruturada (Figura 2). Os *templates* utilizados para modelagens geralmente são provenientes de cristalografia de raio X, característicos pela grande fidelidade à estrutura terciária da proteína. Nestes modelos relacionados às histonas, existe a dificuldade de modelar a estrutura da cauda N-terminal, potencialmente pela grande flexibilidade da região, dificultando a obtenção de dados de estruturação em cristais, mesmo quando em interação com DNA (IWASAKI et al., 2013). Estas evidências nos levaram a questionar se a região N-terminal da proteína, selecionada para a construção do peptídeo sintético, necessita ou não de outra ambientação para desempenhar um possível papel antimicrobiano, uma vez que a interação peptídeo-membrana é um mecanismo de ação antimicrobiano conhecido (HENRIQUES; MELO; CASTANHO, 2006; MELO; FERRE; CASTANHO, 2009). Sendo o interior da bicamada lipídica um ambiente hidrofóbico, tornou-se necessário avaliar o comportamento do peptídeo também em meio hidrofóbico.

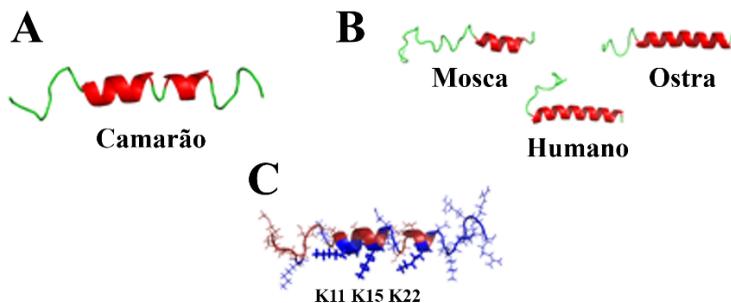
Figura 2 – Modelo em *cartoon* da proteína H2B de *L. vannamei* utilizando a ferramenta SWISS-MODEL. As regiões N e C-terminal estão demarcadas na figura. Regiões de alto grau de identidade e modeladas com sucesso estão representadas pela cor azul; regiões diferentes do *template* e sem estruturação predita estão representadas na cor laranja.



A modelagem da região N-terminal (1-31) da histona H2B de *L. vannamei*, realizada pelo pacote I-Tasser (ZHANG, Yang, 2008), demonstrou conformação helicoidal em duas regiões (10 a 17 e 20 a 24) no modelo 3D com melhor C-score (1,05) para o peptídeo N-terminal; ambas ocupando cerca de 25 % e 16 % do mesmo (Figura 3A). A modelagem desta mesma região, proveniente das demais sequências de H2B dos outros organismos analisados no alinhamento, demonstrou também tendências de formação de hélices, sendo esta conformação estimada em 61 % do peptídeo total para ostras e humanos (Figura 3B). Uma forma de avaliar uma possível estruturação secundária, seria expondo o peptídeo a ambiente hidrofóbico, na tentativa de mimetizar uma possível interação com a membrana celular bacteriana, como já é realizado com outros peptídeos antimicrobianos. Nesta perspectiva, propusemos um modelo sugerindo que pelo menos os aminoácidos K11, K15 e K22 estão expostos e formam uma superfície carregada positivamente de possível interação com a bicamada lipídica (Figura 3C).

A estruturação de peptídeos derivados de H2A foi demonstrada na presença de SDS (KOO et al., 2008). Assim, experimentos de biologia estrutural *in vitro* se fizeram necessários para melhor caracterização do peptídeo N-terminal de H2B também em ambiente hidrofóbico.

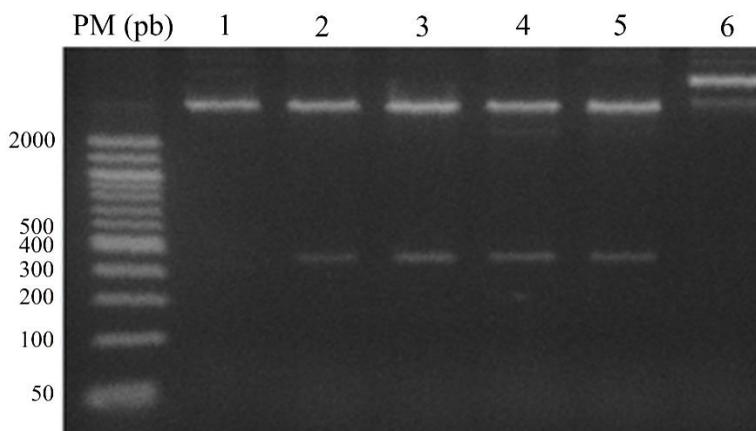
Figura 3 – Modelos da porção N-terminal de H2B de *Litopenaeus vannamei* e outros organismos. A: modelo para o camarão *L. vannamei* mostrando dois segmentos em hélice correspondendo a 25 e 16 % do peptídeo. B: Modelos para outras espécies, *Drosophila melanogaster* (mosca), *Crassostrea gigas* (ostra) e *Homo sapiens* (humano), mostrando também a formação de hélices. C: Estrutura de *L. vannamei*, mostrando os aminoácidos carregados positivamente (K11, K15 e K22), em azul, formando uma superfície estruturada nas α -hélices.



4.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA H2B RECOMBINANTE

O fragmento correspondente ao gene H2B de *L. vannamei* foi clivado e separado por eletroforese em gel de agarose (Figura 4), onde evidenciam-se bandas entre 300 e 400 pb como esperado, segundo o tamanho estimado para o fragmento (~370 pb). O plasmídeo não digerido, como controle, apresentou bandas relativas aos diferentes estados possíveis para o produto da *miniprep*. Não há um gel de confirmação para a ligação do pET-14b + H2Br. No entanto, a cepa de *E. coli* DH5 α transformada com o vetor originou UFCs em placas com ampicilina, apresentando resistência conferida pelo vetor recebido. A extração dos plasmídeos gerou alíquotas em concentrações aproximadas de 1 ng/ μ l.

Figura 4 – Gel de agarose para separação dos fragmentos, clivados pelas enzimas de restrição NdeI e BAMHI referentes ao gene clonado da H2B recombinante de *L. vannamei*. 1 a 5: Vetores clivados, fragmentos com o gene entre 300 e 400 pb. 6: Controle contendo vetor não clivado, demonstrando os dois padrões de envelhecimento de plasmídeos.

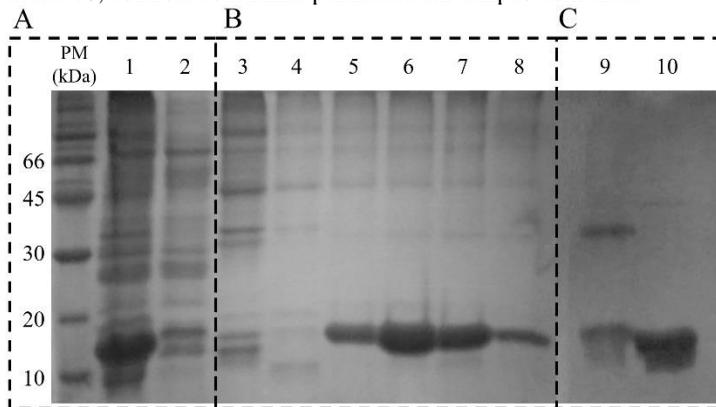


Fonte: O autor

A proteína H2B recombinante (H2Br) foi superexpressa em corpos de inclusão. Na comparação entre as amostras do extrato bacteriano bruto com o sobrenadante proveniente da primeira centrifugação (Figura 5A), percebe-se que há uma banda intensa, referente a H2Br, localizada entre os marcadores de 20 e 10 kDa, corroborando o peso estimado para a

proteína com a cauda his₆ (15,7 kDa). Esta mesma banda não é significativa no poço referente ao sobrenadante, mostrando que a maior concentração da H2Br se encontrava no *pellet* inicial, ou seja, não foi expressa de forma solúvel, mas sim, em corpos de inclusão. Entre os vários protocolos para extração de proteínas dos corpos de inclusão (SINGH et al., 2015), optamos por utilizar a ressolubilização do *pellet* em ureia 6 M devido à facilidade do protocolo. H2Br não apresenta pontes dissulfeto, assim a utilização deste agente desnaturante foi o mais indicado, e o processo de *refolding* facilitado, não acarretando grandes dificuldades.

Figura 5 – SDS-PAGE dos produtos da expressão, purificação e reenovelamento da proteína H2B recombinante (H2Br) de *Litopenaeus vannamei*. A: 1, extrato bruto de *E. coli* BL21 após 3 h de expressão. 2, sobrenadante da primeira centrifugação após lise celular por sonicação. B: 3, fração sem interação com a coluna *HisTrap*. 4, pico 2: 5 a 8, frações de 1 ml referentes ao pico de eluição (pico 4), entre 21 e 25 ml de volume de eluição. C: 9, H2Br dialisada em tampão sem ureia. 10, controle com H2Br purificada em tampão com ureia.

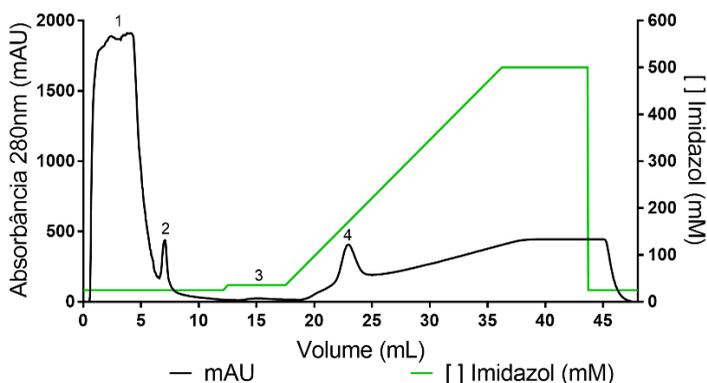


Fonte: O autor

A purificação da proteína H2Br se deu por cromatografia líquida (FPLC) da fração sobrenadante final, obtida após a centrifugação da ressuspensão do *pellet* inicial em tampão 6 M ureia. A proteína foi eluída da coluna em ~150 mM de imidazol, em um pico único (Figura 6). Ao analisar por SDS-PAGE as frações referentes ao pico 4 da purificação, pudemos confirmar que realmente as mesmas se referem à proteína H2Br (15,7 kDa). Seu grau de pureza pôde ser estimado > 90 %, uma vez que se observa uma banda de tamanho esperado predominante no gel. Aparentemente não houve perda significativa de material durante a

aplicação do extrato e lavagem da coluna de afinidade. Isso pôde ser evidenciado comparando-se a eletroforese das frações referentes aos picos 1 e 3 em relação ao pico 4 obtido na eluição durante o gradiente (Figura 5B).

Figura 6 – Cromatograma de purificação da proteína H2Br em FPLC. 1: Material presente no extrato não reagente com a coluna *HisTrap*. 2 e 3: Pequenos picos de absorvância durante a lavagem da coluna. 4: Pico único de eluição da coluna com início a ~150 mM de imidazol.



Fonte: O autor

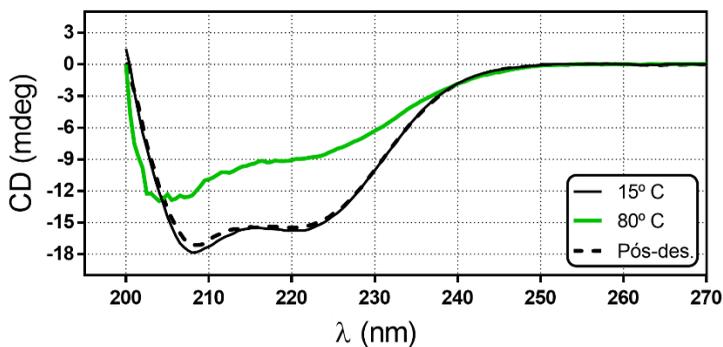
A quantidade de ureia no tampão da H2Br não nos permitia realizar nenhum teste de atividade ou estruturação secundária, pois, a ureia é um poderoso agente desnaturante de proteínas. Durante o processo de diálise, ocorreram perdas significativas de proteína. Fato constatado por quantificação anterior e posterior à diálise. Acreditamos que, devido ao ponto isoelétrico teórico bastante básico (10.39), poderia haver interação entre as próprias moléculas de histona, bem como com possíveis impurezas, filtros, ou até mesmo com a superfície do microtubo no qual se encontravam. Adicionamos concentrações altas de NaCl no tampão para melhor estabilização e solubilização da proteína, sem grande sucesso. A melhor alternativa, foi realizar diálises das amostras obtidas da purificação em concentrações elevadas de glicerol (30 e 50 %). O glicerol ajuda em muito a solubilizar altas concentrações de proteínas, aumentando o intervalo de concentração até o limite para precipitação das mesmas. Além disso, segundo as referências consultadas, o glicerol não interfere em análises de estruturação secundária por difração de raios X (KELLY; PRICE, 2000) e nem em testes antimicrobianos (SAEGEMAN et al., 2008). O sucesso do protocolo de renovelamento foi comprovado

parcialmente pela análise em SDS-PAGE, onde evidenciamos uma possível oligomerização (> 30 kDa) (Figura 5C). É sabido que a oligomerização é muito dificultada em presença de ureia, uma vez que este fenômeno depende da estruturação da proteína (BENNION; DAGGETT, 2003). Isto sugere que esta substância não se encontrava mais em concentrações altas na amostra obtida a partir da purificação ($\sim 24 \mu\text{M}$).

4.3 DICROÍSMO CIRCULAR DA H2BR E DO PEPTÍDEO N-TERMINAL

O reenovelamento da H2Br também foi confirmado por dicroísmo circular, mostrando um espectro com picos negativos a 208 e 222 nm, o qual, quando comparado com modelos, se mostrou característico de conformação predominantemente em hélice, como estimado por nossas análises *in silico*. A exposição da proteína a temperaturas crescentes com máximo em 80°C demonstrou pouca variação no espectro, com leve deslocamento do pico negativo em 208 nm para a esquerda. Além disso, quando resfriada a 15°C novamente, o espectro retornou a sua conformação inicial praticamente por completo, indicando que a estruturação secundária inicial foi recuperada (Figura 7).

Figura 7 - Espectro de dicroísmo circular (CD) de $3 \mu\text{M}$ H2Br em 10 mM fosfato pH 7,0, com intervalo de 200 a 270 nm, mostrando picos negativos a 208 e 222 nm (linha preta). Proteína a 80°C (linha verde) e a 15°C , pós-desnaturação, (tracejado).



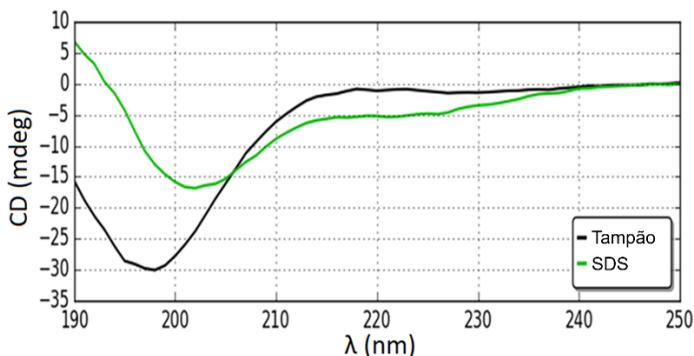
Fonte: O autor

O peptídeo N-terminal (1-31) foi também analisado por CD em duas condições: Tampão e SDS (Figura 8). Em tampão, apresentou

característica de estrutura desenovelada, com um grande pico negativo a 198 nm, e ausência de pico positivo na região de 190 nm. A análise com o programa CAPITO demonstrou que o peptídeo se apresenta como uma molécula desenovelada. Quando desafiado em ambiente hidrofóbico, 20 mM SDS, a estrutura apresentou deslocamento do pico mínimo negativo para 203 nm e pico positivo em 190 nm. Além disso, a região 222 nm passou a ser mais negativa, conforme mostra a figura 8. A quantificação feita pelo programa CAPITO classifica a estrutura como *Monten globule* quando em SDS, coerente com as características que estamos analisando de um peptídeo desestruturado que passou a ganhar estrutura em ambiente hidrofóbico. Estes espectros em SDS foram quantificados pelo programa Selcon e Contin-LL da plataforma Dichroweb, obtendo-se valores de hélice de 19 % e 54 % respectivamente. Os espectros em tampão apresentam conteúdo de hélice de apenas 1 %.

Os modelos de interação com membrana para uma série de peptídeos antimicrobianos sugerem estruturação em hélice ao entrar em contato com ambientes hidrofóbicos (KOO et al., 2008; PARRY et al., 2008). Acreditamos que, para a H2B de *L. vannamei*, este possa ser o mecanismo adotado, uma vez que devido ao peptídeo ser bastante catiônico, a interação com a região polar negativa da membrana é facilitada. De acordo com nossas buscas bibliográficas esta é a primeira vez que se mostra a estruturação 3D de um peptídeo derivado de H2B de qualquer espécie.

Figura 8 - Espectro de dicroísmo circular (CD) do peptídeo N-terminal da H2B de *Litopenaeus vannamei*: 35 μ M em 5 mM fosfato pH 7,0 (linha preta), e em 20 mM SDS, 5 mM fosfato pH 7,0 (linha verde).

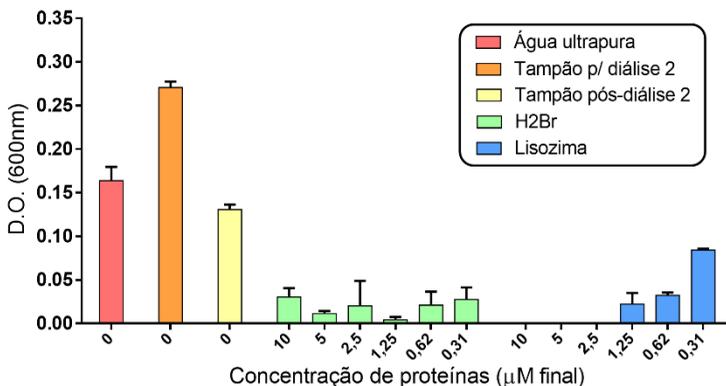


Fonte: O autor

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA H2BR CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*

Nas condições testadas, a proteína H2Br aparentemente causou a inibição do crescimento de bactérias gram-negativas *V. parahaemolyticus* em todas as concentrações testadas, quando comparada aos controles. Curvas de crescimento bacteriano foram obtidas para todas as condições testadas, e todas coincidiram com um pico máximo de crescimento em 9 horas de teste. Estes picos foram plotados em gráfico para melhor visualização dos resultados (Figura 9). O controle com água ultrapura teve crescimento aparente menor em relação ao tampão para diálise 2. Hipotetizamos que a presença de substâncias tamponantes na solução não somente contribuem para estabilizar o pH do meio, como, possivelmente, contribuem também para manter um equilíbrio osmótico ideal para o crescimento de *V. parahaemolyticus*, a qual é um pouco halófila e necessita de 3 % NaCl para crescimento ótimo (KIM, Yoo Won et al., 2012). Tendo em vista que a adição de água ultrapura equivale a ~1/3 do volume total do ensaio, este equilíbrio osmótico diminui o suficiente para afetar negativamente o crescimento da bactéria gram-negativa em questão.

Figura 9 – Teste de atividade antimicrobiana da histona H2B de *L. vannamei* recombinante contra *V. parahaemolyticus*. Gráfico de densidade ótica dos picos obtidos em 9 h de incubação.



Fonte: O autor

Os controles referentes aos tampões para diálise 2 e pós-diálise 2, apresentaram maior e menor crescimento aparente, respectivamente.

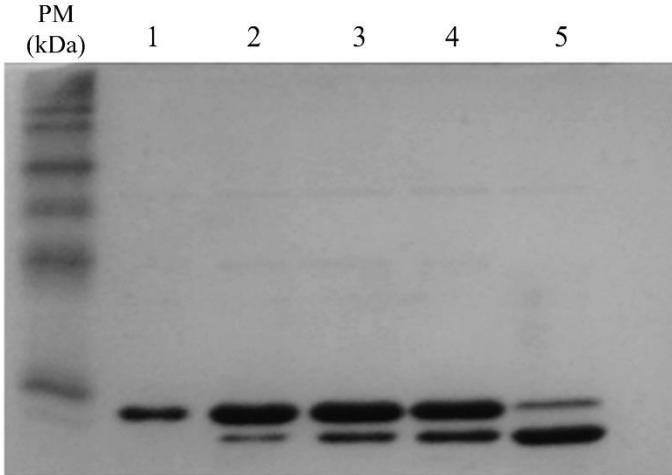
Deste modo, podemos inferir que concentrações residuais de alguma molécula ou substância no tampão pós-diálise 2, da proteína purificada, inibem parcialmente o crescimento da cultura. O imidazol é uma molécula com capacidade de potencializar a atividade antimicrobiana de outras moléculas quando a elas conjugado, apresentando concentrações mínimas inibitórias estimadas na casa de nano molar (KIM, Hong-Seok et al., 2013; SHARMA et al., 2009; SHINGALAPUR; HOSAMANI; KERI, 2009). Não sabemos se esta molécula por si, não conjugada, é capaz de interferir nos nossos resultados, uma vez que a concentração final deste composto no tampão pós-diálise 2 e nas proteínas testadas está estimada em $\sim 0,8 \mu\text{M}$ final, muitas vezes acima da concentração inibitória relatada nos trabalhos citados anteriormente. A ureia na concentração de 2,5 % foi capaz de inibir o crescimento de bactérias *E. coli* estabelecendo esta concentração final como mínima inibitória. Qualquer outro valor menor que este permitiu crescimento parcial das colônias (KAYE, 1968). 2,5 % de ureia, ou 416 mM final, é uma quantidade muito maior do que a presente no nosso tampão pós-diálise 2, o qual segundo nossas estimativas contém $\sim 24 \mu\text{M}$ final. Segundo nossas buscas bibliográficas, não há relatos na literatura de vibriões desafiados com ureia. Por *Vibrio parahaemolyticus* ser uma bactéria gram-negativa também, sugerimos que nessa quantidade, a ureia não afetaria o crescimento bacteriano dos testes com o tampão pós-diálise 2 e as proteínas, H2Br e lisozima.

Analisando os picos de crescimento obtidos das curvas da lisozima, podemos estabelecer que a concentração mínima inibitória, nas condições testadas, está em torno de $2,5 \mu\text{M}$, sendo a inibição reduzida conforme a diluição da proteína. Este mesmo padrão não foi observado na proteína H2Br, possivelmente por erros de pipetagem (desvio padrão alto) e artefatos gerados durante a leitura, como bolhas nos poços onde a proteína H2Br estava mais concentrada. Ainda assim, podemos observar que o pico de crescimento da H2Br mais diluída não ultrapassou o pico equimolar da lisozima. KAWAZAKI et al., 2008, relatou a concentração mínima inibitória para a H2B de *L. vannamei* como $11 \mu\text{M}$, no entanto, suas concentrações mais diluídas tiveram crescimento em torno de 0,3 de DO, muito parecido com seu 0. Este resultado é bastante diferente do evidenciado em nossos testes, uma vez que nenhuma das concentrações de H2Br permitiu crescimento acima de 0,05 de DO, valor muito abaixo dos controles negativos.

H2Br foi testada com a cauda de histidina, devido à pouca disponibilidade de proteína purificada e dialisada. As frações dialisadas foram concentradas em tubo concentrador, porém, o processo envolvendo

esses tubos demanda grandes quantidades de proteína para um saldo final relativamente baixo em concentração. A clivagem foi experimentada e preliminarmente demonstrada como possível (Figura 10). Mesmo com o marcador pouco visível no gel, nossas análises *in silico* não identificaram possíveis sítios de clivagem por trombina, além do conferido pelo pET-14b. Não podemos afirmar que os resultados evidenciados são exclusivamente da atividade antimicrobiana da H2Br, uma vez que a mesma ainda contém a His₆. Foi relatado que a *HisTag* pode potencializar a ancoragem ou interação de peptídeos com elementos da membrana celular bacteriana carregados negativamente (TAVARES et al., 2012).

Figura 10 – Avaliação por SDS-PAGE do processo de clivagem por trombina da *HisTag* ligada à H2Br. Tempos de hidrólise: 0, 1, 2, 3 h e *overnight*, a 4 °C, representados respectivamente em 1, 2, 3, 4 e 5.



Fonte: O autor

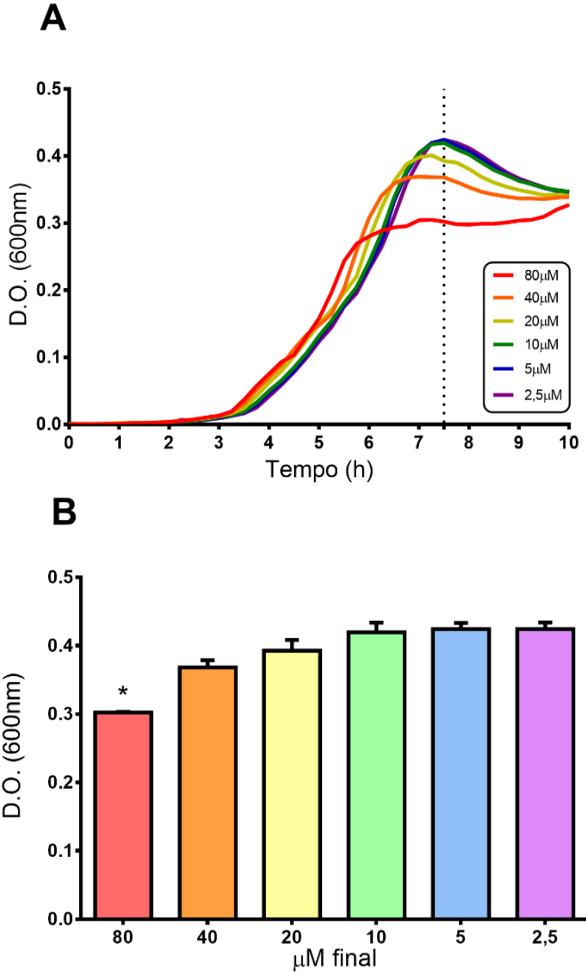
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO N-TERMINAL DA H2B CONTRA *V. parahaemolyticus*

Nas concentrações testadas, o peptídeo N-terminal da H2B mostrou atividade antimicrobiana aparente *in vitro*. Ainda que estatisticamente esse resultado seja significativo apenas na maior concentração testada, 80 μ M final ($p < 0,05$), é visível um aumento do pico de absorbância conforme a diluição, até a observação de um *plateau* nas menores concentrações. As análises estatísticas das curvas de crescimento apontam que todas refletem a mesma taxa de crescimento

exponencial, diferindo entre si apenas no pico máximo de crescimento, o qual foi plotado em gráfico separadamente para teste-t. Não houve controles com tampão ou outras proteínas nestes testes. Ainda assim, acreditamos que a curva de diluição do peptídeo deixou claro o *shift* do pico máximo de crescimento em 7h30m, sugerindo potencial atividade antimicrobiana. A escolha desta região N-terminal da H2B para os testes de atividade antimicrobiana, deu-se pelas diferenças significativas entre as regiões N-terminal das proteínas analisadas, e pela presença de um sítio de clivagem por OMP-T. Outros AMP podem ser gerados neste processo. Com base nos dados obtidos, sugerimos que esta região esteja efetivamente ligada à atividade antimicrobiana observada para a proteína inteira, sendo o peptídeo testado um dos peptídeos ativos gerado. Estes dados também corroboram a análise estrutural, uma vez que o peptídeo apresentou tendência à conformação α -hélice em ambiente hidrofóbico, característica muito bem descrita para peptídeos ativos dessa natureza (HENRIQUES; MELO; CASTANHO, 2006).

É esperado que AMP sejam ativos apenas em grandes concentrações. Estudos demonstram que vários peptídeos antimicrobianos testados *in vitro*, aparentemente fora das condições fisiológicas, possuem alta afinidade pela membrana bacteriana e são encontrados em maior concentração nas bactérias em comparação com o meio de suspensão do ensaio (MELO; FERRE; CASTANHO, 2009). Os dados obtidos nos testes aqui realizados, envolvendo esse peptídeo da H2B são bastante preliminares. Uma vez que os resultados obtidos pelas análises *in silico* e *in vitro* foram bastante promissores, novos testes necessitam ser realizados, para estabelecer uma concentração mínima inibitória e sugerir um mecanismo de ação, dentre os diversos descritos.

Figura 11 - Teste de atividade antimicrobiana do peptídeo N-terminal da histona H2B de *L. vannamei* contra *V. parahaemolyticus*. A: Curvas de crescimento relativas a 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 μ M final do peptídeo com densidade ótica máxima (pico) obtida em 7h30m de incubação. As curvas possuem a mesma taxa exponencial de crescimento ($p < 0,05$). B: Gráfico de barras dos picos referentes às diluições do peptídeo, * indica diferença estatística ($p < 0,05$).



Fonte: O autor

5 CONCLUSÃO

A análise *in silico* da proteína H2B de *L. vannamei* apresentou dados promissores envolvendo, inclusive, atividade antimicrobiana potencial, assim como sua região N-terminal, a qual mais difere no alinhamento com outras outras sequências de H2B, principalmente da H2B de *C. gigas*, para a qual já foi relatada atividade antimicrobiana.

Após clonada, a proteína pôde ser expressa, purificada e reenovelada. O procedimento de diálise foi efetivo, diminuindo em muito a concentração de imidazol e ureia na solução, como pôde ser evidenciado por meio da sua possível oligomerização. No entanto, as concentrações residuais dessas substâncias ainda podem ser consideradas como interferentes, sendo necessário diminuí-las ainda mais para o refinamento dos resultados obtidos.

A H2Br demonstrou atividade antimicrobiana nas condições testadas, sendo a mesma maior do que aquela observada para a lisozima em concentrações equimolares. A cauda de histidina e os resquícios de imidazol podem ter interferido nos resultados. Novos testes com a proteína H2Br sem *HisTag* e com outras condições de diálise devem ser realizados. Deve ser considerado que a Histidina é um aminoácido carregado positivamente no pH utilizado, e que devido ao seu número e à proximidade entre resíduos, pode gerar falso positivo nos ensaios de atividade antimicrobiana.

O peptídeo N-terminal também apresentou atividade antimicrobiana nas condições testadas. Sugerimos que este possa ser um dos peptídeos gerados na clivagem da proteína completa pelas OMP-T bacterianas. Novos testes envolvendo o peptídeo sintético precisam ser realizados para estimativa da concentração mínima inibitória, testando concentrações > 80 μ M final.

Nossos testes envolveram apenas vibriões, bactérias gram-negativas. Cientes de suas particularidades em relação à membrana celular, testes envolvendo bactérias gram-positivas se fazem necessários, para identificar se a atividade antimicrobiana se mantém, e permitir inferir a ocorrência de mecanismos diferentes daqueles sugeridos para bactérias gram-negativa

Mecanismos de prevenção ou remediação de enfermidades em cultivos de *L. vannamei* são necessários devido à sua importância econômica. As informações apresentadas neste trabalho, ainda que preliminares, auxiliam no desenvolvimento de ferramentas que possam vir a enriquecer o processo de minimizar os prejuízos frequentes à atividade da carcinicultura. Uma vez que a histona H2B possa vir a ser

identificada como atuante efetiva nos processos de defesa dos camarões, por si só, em conjunto com outras histonas e/ou proteínas, ou por meio de peptídeos, compostos com propriedades estimulantes podem ser administrados com o intuito de aumentar a presença dessas proteínas nos tecidos, de forma intra e extracelular ou também por secreção mais elevada.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE GUZMAN, Gabriel et al. Penaeid Shrimp Immune System. **The Thai veterinary medicine**, v. 39, p. 205–215, 1 set. 2009.
- ARNOLD, Konstantin et al. The SWISS-MODEL Workspace: A Web-Based Environment for Protein Structure Homology Modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195–201, 15 jan. 2006.
- AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, Zoonoses: Advances and Perspectives. v. 140, n. 3, p. 310–317, 27 jan. 2010.
- BACHÈRE, Evelyne et al. Insights into the Anti-Microbial Defense of Marine Invertebrates: The Penaeid Shrimps and the Oyster *Crassostrea Gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 149–168, 5 mar. 2004.
- BENNION, Brian J.; DAGGETT, Valerie. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5142–5147, 29 abr. 2003.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRINKMANN, Volker; ZYCHLINSKY, Arturo. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? **The Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 5, p. 773–783, 3 set. 2012.
- DANIEL, Alexandre. **Estudo da digestão de proteínas com ênfase na distribuição espacial das proteinases digestivas do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei***. 2014. 68 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- DRÁB, Tomáš et al. The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 3, p. 987–990, 17 jan. 2014.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

GONÇALVES-SOARES, Daniela et al. Identification of differentially transcribed genes in shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to osmotic stress and challenged with WSSV virus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 7, n. 1, p. 73–81, 1 mar. 2012.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V.; PANDIT, M. W. Correlation between Stability of a Protein and Its Dipeptide Composition: A Novel Approach for Predicting in Vivo Stability of a Protein from Its Primary Sequence. **Protein Engineering**, v. 4, n. 2, p. 155–161, dez. 1990.

HALVERSON, Tyler W. R. et al. DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004593, 15 jan. 2015.

HENRIQUES, Sónia Troeira; MELO, Manuel Nuno; CASTANHO, Miguel A. R. B. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? **Biochemical Journal**, v. 399, n. Pt 1, p. 1–7, 1 out. 2006.

IWASAKI, Wakana et al. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. **FEBS Open Bio**, v. 3, p. 363–369, 22 ago. 2013.

JONES, David T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices¹ Edited by G. Von Heijne. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, n. 2, p. 195–202, 17 set. 1999.

KAWASAKI, Hiroaki et al. Antimicrobial action of histone H2B in *Escherichia coli*: Evidence for membrane translocation and DNA-binding of a histone H2B fragment after proteolytic cleavage by outer membrane proteinase T. **Biochimie**, v. 90, n. 11, p. 1693–1702, 1 nov. 2008.

KAYE, Donald. Antibacterial activity of human urine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 10, p. 2374–2390, out. 1968.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **Current Protein & Peptide Science**, v. 1, n. 4, p. 349–384, dez. 2000.

KIM, Hong-Seok et al. Synthesis and antimicrobial activity of imidazole and pyridine appended cholestane-based conjugates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 15, p. 4315–4318, 1 ago. 2013.

KIM, Yoo Won et al. Effect of Temperature on Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Flounder, Salmon Sashimi and Oyster Meat. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 12, p. 4662–4675, dez. 2012.

KONAGURTHU, Arun S. et al. MUSTANG: A Multiple Structural Alignment Algorithm. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 64, n. 3, p. 559–574, 30 maio 2006.

KOO, Young Sook et al. Structure–activity relations of parasin I, a histone H2A-derived antimicrobial peptide. **Peptides**, v. 29, n. 7, p. 1102–1108, 1 jul. 2008.

LEE, So Young; LEE, Bok Luel; SÖDERHÄLL, Kenneth. Processing of an Antibacterial Peptide from Hemocyanin of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus Leniusculus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 7927–7933, 3 jul. 2003.

MCCARTER, John D. et al. Substrate Specificity of the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease OmpT. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 17, p. 5919–5925, set. 2004.

MELO, Manuel N.; FERRE, Rafael; CASTANHO, Miguel A. R. B. Antimicrobial Peptides: Linking Partition, Activity and High Membrane-Bound Concentrations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 245–250, mar. 2009.

MÜLLER, Isabel Cristina. **Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopennaeus vannamei* infectados pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca e genotipagem de isolados geográficos brasileiros do vírus**. 2009. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

NG, Tze Hann et al. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 4, p. 644–651, 1 dez. 2013.

OTERO-GONZÁLEZ, Anselmo Jesus et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 5, p. 1320–1334, 11 jan. 2010.

PARRY, Mikko J. et al. High-Affinity Small Molecule–Phospholipid Complex Formation: Binding of Siramesine to Phosphatidic Acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 39, p. 12953–12960, 1 out. 2008.

PATAT, Séverine A. et al. Antimicrobial Activity of Histones from Hemocytes of the Pacific White Shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 23–24, p. 4825–4833, 7 dez. 2004.

POIRIER, Aurore C. et al. Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 36, p. 24821–24831, 5 set. 2014.

RAMOS-CARREÑO, Santiago et al. White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Exposed to Low and High Salinity. **Archives of Virology**, v. 159, n. 9, p. 2213–2222, 1 set. 2014.

ROSA, Rafael D.; BARRACCO, Margherita A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, p. 262–284, 9 nov. 2010.

ROWLEY, Andrew F.; POWELL, Adam. Invertebrate Immune Systems–Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific? **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 11, p. 7209–7214, 1 dez. 2007.

SAEGEMAN, Veroniek S. M. et al. Short- and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in the preservation of skin allografts. **Burns**, v. 34, n. 2, p. 205–211, 1 mar. 2008.

SCHULENBURG, Hinrich; BOEHNISCH, Claudia; MICHIELS, Nico K. How do invertebrates generate a highly specific innate immune

response? **Molecular Immunology**, v. 44, n. 13, p. 3338–3344, 1 jul. 2007.

SHARMA, Deepika et al. Synthesis, antimicrobial and antiviral evaluation of substituted imidazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2347–2353, 1 jun. 2009.

SHINGALAPUR, Ramya V.; HOSAMANI, Kallappa M.; KERI, Rangappa S. Synthesis and evaluation of in vitro anti-microbial and anti-tubercular activity of 2-styryl benzimidazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 4244–4248, 1 out. 2009.

SILHAVY, Thomas J.; KAHNE, Daniel; WALKER, Suzanne. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, maio 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857177/>>. Acesso em: 25 maio 2018.

SINGH, Anupam et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, 25 mar. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4379949/>>. Acesso em: 14 set. 2018.

SPERSTAD, Sigmund V. et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. **Biotechnology Advances**, Marine Biotechnology in Europe. v. 29, n. 5, p. 519–530, 1 set. 2011.

TAVARES, Letícia Stephan et al. Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 294–300, 1 out. 2012.

VALENTIM-NETO, Pedro Alexandre; FRAGA, Ana Paula de Medeiros; MARQUES, Maria Risoleta Freire. Differential expression of proteins in the gills of *Litopenaeus vannamei* infected with white spot syndrome virus. **Aquaculture International**, v. 22, n. 5, p. 1605–1620, out. 2014.

WIEDEMANN, Christoph; BELLSTEDT, Peter; GÖRLACH, Matthias. CAPITO—a Web Server-Based Analysis and Plotting Tool for Circular Dichroism Data. **Bioinformatics**, v. 29, n. 14, p. 1750–1757, 15 jul. 2013.

WIMLEY, William C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. **ACS chemical biology**, v. 5, n. 10, p. 905–917, 15 out. 2010.

YOUSEFI, Shida et al. Catapult-like Release of Mitochondrial DNA by Eosinophils Contributes to Antibacterial Defense. **Nature Medicine**, v. 14, n. 9, p. 949–953, set. 2008.

ZHANG, Xiaojing; SONG, Xiaoling; HUANG, Jie. Impact of *Vibrio Parahaemolyticus* and White Spot Syndrome Virus (WSSV) Co-Infection on Survival of Penaeid Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 34, n. 6, p. 1278–1286, 1 nov. 2016.

ZHANG, Yang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 40, 23 jan. 2008.