



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

Gabriel Machado Matos

**Novos fatores anti-lipopolissacarídeos em camarões peneídeos: uma família multigênica
de peptídeos antimicrobianos com potencial biotecnológico**

Florianópolis

2022

Gabriel Machado Matos

**Novos fatores anti-lipopolissacarídeos em camarões peneídeos: uma família multigênica
de peptídeos antimicrobianos com potencial biotecnológico**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa
Coorientadora: Prof^a, Dr^a. Luciane Maria Perazzolo

Florianópolis

2022

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

Matos, Gabriel Machado
Novos fatores anti-lipopolissacarídeos em camarões
peneídeos: uma família multigênica de peptídeos
antimicrobianos com potencial biotecnológico / Gabriel
Machado Matos ; orientador, Rafael Diego da Rosa,
coorientadora, Luciane Maria Perazzolo, 2022.
145 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biotecnologia. 3.
Peptídeos antimicrobianos. 4. Imunidade de invertebrados
marinhos. 5. Antibióticos naturais. I. Rosa, Rafael Diego
da. II. Perazzolo, Luciane Maria. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Gabriel Machado Matos

Novos fatores anti-lipopolissacarídeos em camarões peneídeos: uma família multigênica de peptídeos antimicrobianos com potencial biotecnológico

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

Prof^a. Gislaine Fongaro, Dr^a.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Fabiano Lopes Thompson, Dr.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a Daniela Barretto Barbosa Trivella, Dr^a.

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Rafael Diego da Rosa, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa por todos os ensinamentos nesses anos de trabalho conjunto. Agradeço pela orientação, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos valiosos sobre ciência, rigor científico e profissionalismo e por todas as oportunidades de crescimento profissional que você me proporcionou.

Agradeço à minha coorientadora Prof^ª. Dr^ª. Luciane Maria Perazzolo pelo carinho, por toda contribuição na minha formação ao longo desses anos e pelos ensinamentos sobre determinação no meio acadêmico.

Agradeço ao meu coorientador no exterior Prof. Dr. Björn Andersson pela confiança no meu trabalho, por todos os ensinamentos sobre protozoários e bioinformática e pela oportunidade de trabalhar em projetos tão desafiadores.

Agradeço aos membros da banca Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Fongaro, Prof. Dr. Fabiano Thompson, Prof^ª. Dr^ª. Daniela Trivella, Prof. Dr. Ricardo Mazzon e Prof. Dr. Hernán Terenzi pela disponibilidade de avaliar este trabalho e pela contribuição prestada.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências por toda formação e oportunidades de desenvolvimento profissional ao longo desses anos.

Agradeço às agências de fomento FAPESC, CAPES e CNPq pelo financiamento dos projetos que permitiram a realização deste trabalho, assim como pela bolsa fornecida. Agradeço ao Programa Institucional de Internacionalização da Capes (Capes PrInt) e ao Programa *Joint Brazilian-Swedish Research Collaboration* (STINT) pelas bolsas que permitiram a realização do meu doutorado sanduíche.

Agradeço aos queridos colegas de trabalho que compõem ou compuseram o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura nesses últimos seis anos. Nesse ambiente aprendi o verdadeiro significado do trabalho em equipe e a importância de um ambiente instigante para pensar e fazer ciência. Essa jornada não teria sido a mesma se não pudesse contar com a amizade de vocês. Agradeço em especial ao Nicolas Conceição e ao Cairé Barreto pelas várias horas discutindo resultados e pensando em experimentos, ao Natanael Dantas, Mariana Pilotto, Talita Gagliardi e Gustavo Rocha pela amizade e pelo companheirismo ao longo desses anos. Agradeço a Juliana Ferreira e Beatriz Garcia pela companhia nesses últimos meses e por toda a força (de maneira literal e figurativa) que vocês prestaram nas últimas purificações.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Paulina Schmitt pela síntese dos peptídeos utilizados neste trabalho, assim como pelo caloroso acolhimento durante o estágio em seu laboratório e por todos os ensinamentos e colaborações nos últimos anos.

Agradeço ao Prof. Hernán Terenzi pelas discussões sobre purificação e estrutura de proteínas e especialmente por sempre ter disponibilizado a estrutura do seu laboratório quando precisamos.

Agradeço às professoras Gislaine Fongaro e Izabella da Silva do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC e seus alunos pelos ensaios de citotoxicidade dos peptídeos sintéticos.

Agradeço aos professores e alunos do Laboratório de Protozoologia da UFSC por todo auxílio prestado ao longo desses anos, em especial aos professores Edmundo Grisard e Patrícia Stoco. Agradeço ao professor Glauber Wagner do Laboratório de Bioinformática da UFSC e em especial a Tatiany Soratto e Guilherme Maia por todos os ensinamentos de bioinformática.

Agradeço ao Dr. Pedro Ismael pelos ensinamentos sobre purificação de peptídeos antimicrobianos e pela colaboração durante o estágio no Instituto Butantã.

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

Agradeço à infraestrutura e ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia e do Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural da UFSC pela colaboração.

Agradeço aos colegas de corredor do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual pela companhia e ajuda prestada quando necessário, em especial à Maiara Marques pela amizade cultivada ao longo desses anos.

Agradeço à Prof^a Dr^a Maria Risoleta Freire Marques por ter aberto as portas do seu laboratório na minha primeira iniciação científica e por ter me introduzido ao mundo das proteínas.

Agradeço a Tomás Pessatti pelo carinho e apoio ao longo dessa e de tantas outras jornadas e por tudo o que representa na minha vida.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou e esteve do meu lado em todos os momentos. Agradeço em especial aos meus pais por investirem desde cedo na minha educação, pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem a buscar os meus sonhos e por sempre acreditarem no meu potencial.

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

RESUMO

Os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) compõem uma importante família de peptídeos antimicrobianos (AMPs), apresentando um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Esses peptídeos possuem dois resíduos de cisteína conservados formando uma estrutura em β -hairpin essencial para sua atividade antimicrobiana. O presente estudo propôs, inicialmente, investigar a diversidade molecular dos ALFs em camarões peneídeos. Desta análise, conclui-se que em camarões peneídeos existem sete grupos distintos de ALFs (Grupos A a G) e pelo menos dois outros grupos de peptídeos relacionados aos ALFs, aqui denominados *ALFs-like*. Esses peptídeos são codificados por genes distintos que compartilham a mesma estrutura gênica e codificam peptídeos com propriedades bioquímicas distintas. As implicações biológicas dessa diversidade foram avaliadas na espécie de camarão mais cultivada no mundo, *Litopenaeus vannamei*. Os ALFs de *L. vannamei* (*Litvan* ALF-A a -G) mostraram-se expressos em hemócitos e diferencialmente regulados mediante infecções experimentais bacterianas e virais. Os *ALFs-like* (*Litvan* ALF-3cys e *Litvan* ALF-4cys) mostraram-se majoritariamente expressos nas gônadas e sua expressão não modulou durante os desafios com bactérias e vírus. Peptídeos sintéticos derivados do β -hairpin dos novos ALFs identificados em *L. vannamei* (*Litvan* ALF-E a -G) apresentaram espectros de atividade antimicrobiana distintos indicando sua divergência funcional. Em conjunto, esses resultados demonstram que os ALFs de *L. vannamei* compõem uma família altamente diversa de AMPs, tanto em nível de sequência, como de expressão gênica e funcionalidade. Por fim, avaliou-se o potencial uso biotecnológico dos novos ALFs identificados (*Litvan* ALF-E a -G), analisando peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas. Esses peptídeos apresentaram uma estrutura em α -hélice, diferente daquela observada na molécula nativa e se mostraram capazes de formar poros em membranas bacterianas. Ademais, esses peptídeos apresentaram um amplo espectro de atividade antibacteriana e uma baixa citotoxicidade para células de mamíferos, reforçando o potencial biotecnológico de ALFs de camarões marinhos para o desenvolvimento futuro de novos antibióticos.

Palavras-chave: peptídeos de defesa do hospedeiro; anti-LPS; artrópodes; antibióticos naturais.

ABSTRACT

Anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) comprise an important family of antimicrobial peptides (AMPs) with a broad spectrum of antimicrobial activity. These peptides display two conserved cysteine residues holding a central β -hairpin structure responsible for their antimicrobial activity. First, this study aimed to investigate the diversity of ALFs in penaeid shrimp. Seven distinct groups of ALFs and at least two groups of ALF-like peptides were identified in penaeid shrimp. Distinct genes sharing a similar gene structure encode these peptides displaying distinct biochemical features. The biological implications of such diversity was investigated in the most cultivated species worldwide, *Litopenaeus vannamei*. *L. vannamei* ALFs genes (*Litvan* ALF-A to -G) showed to be expressed in hemocytes and differentially regulated in response to experimental infections. *L. vannamei* ALF-like genes (*Litvan* ALF-3cys and *Litvan* ALF-4cys) showed to be expressed mainly in gonads and their expression were not affected by microbial challenges. Synthetic peptides based on the central β -hairpin of the novel ALFs identified in *L. vannamei* (*Litvan* ALF-E to -G) showed distinct antimicrobial activity suggesting the functional divergence of these peptides. Altogether, these results confirm that ALFs comprise a diverse multigene family of AMPs, from sequence to expression regulation and function. Furthermore, the application of synthetic peptides derived from the region between cysteines of the novel ALFs (*Litvan* ALF-E to -G) was evaluated as potential novel antibiotics. These peptides displayed an α -helix secondary structure, distinct from what is observed in the native peptide, and were able to form pores in bacteria membranes. These peptides showed a broad antimicrobial spectrum and no cytotoxicity to mammal cells, indicating that ALFs represent an interesting family of bioactive molecules whose studies can contribute to the discovery of novel antibiotics based on AMPs.

Keywords: *host-defense peptides*; anti-LPS; arthropods; antibiotics

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1 - Principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos.....17
- Figura 2 - Estrutura 3D resolvida do ALF do camarão *Penaeus monodon*.....21

CAPÍTULO I: Revisão sobre peptídeos antimicrobianos em crustáceos

- Figure 1 - Antimicrobial peptides (AMPs) from crustaceans.....30
- Figure 2 - The crustacean AMP timeline.....32
- Figure 3 - Widely distributed crustacean AMPs: crustins and anti-lipopolysaccharide factors (ALFs).....35
- Figure 4 - Taxonomically-restricted crustacean AMPs from penaeid shrimp: penaeidins and stylicins.....41
- Figure 5 - Taxonomically-restricted crustacean AMPs from nonpenaeid shrimp.....43
- Figure 6 - Schematics of the main roles played by crustacean AMPs.....51
- Supplementary Figure 1 - Primary structure of penaeid shrimp AMPs.....66

CAPÍTULO II - SEÇÃO A: Diversidade molecular e funcional de ALFs de camarões peneídeos

- Figure 1 - The seven members of the shrimp ALF family.....78
- Figure 2 - ALFs form a diverse antimicrobial peptide family in decapod crustaceans.....80
- Figure 3 - Tissue expression distribution of shrimp ALFS and gene modulation in hemocytes in response to pathogen challenge and tissue damage.....82
- Figure 4 - Expression of ALFs during shrimp development.....84
- Figure 5 - The antimicrobial spectrum of the novel shrimp ALFs.....85

CAPÍTULO II - SEÇÃO B: Identificação e caracterização molecular e transcricional de *ALFs-like* em camarões peneídeos

- Figura 1 - Alinhamento entre ALFs e *ALFs-like*.....100
- Figura 2 – Reconstrução filogenética de ALFs e peptídeos relacionados a ALFs.....102
- Figura 3 - Distribuição da expressão gênica de ALFs-3cys e ALFs-4cys em *Litopenaeus vannamei*.....103
- Figura 4 – Níveis de transcritos de ALF-3cys e ALF-4cys no intestino médio de *L. vannamei*.....104
- Figura 5 – Níveis de transcritos de ALFs-3cys e ALFs-4cys em diferentes tecidos de *L. vannamei* e ao longo do seu desenvolvimento embrionário106

CAPÍTULO III: Potencial biotecnológico de peptídeos derivados de ALFs

Figura 1 - Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos derivados de ALFs.....	117
Figura 2- Ensaio de permeabilidade de membrana de <i>E. coli</i> ML35.....	120
Figura 3 – Ensaio de citotoxicidade dos peptídeos derivados de ALFs contra células de mamíferos	122

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II - SEÇÃO B: Identificação e caracterização molecular e transcricional de *ALFs-like* em camarões peneídeos

Quadro 1 – Sequência dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica.....97

Quadro 2 - Caracterização molecular dos *ALFs-like* de peneídeos.....100

CAPÍTULO III: Potencial biotecnológico de peptídeos derivados de ALFs

Quadro 1 – Sequência aminoacídica, massa molecular (MM) e ponto isoelétrico teórico (pI) dos peptídeos sintéticos.....113

Quadro 2 – Microrganismos e condições de cultivo.....114

Quadro 3 - Espectro de atividade antimicrobiana de peptídeos sintéticos derivados dos ALFs dos Grupos E, F e G de *Litopenaeus vannamei*.....119

Quadro 4 - Atividade antimicrobiana sinérgica entre os peptídeos sintetizados.....121

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Revisão sobre peptídeos antimicrobianos em crustáceos

Supplementary Table 1 - Summary of minimal inhibitory concentrations (MIC) for crustaceans AMPs.....63

CAPÍTULO II - SEÇÃO A: Diversidade molecular e funcional de ALFs de camarões peneídeos

Table 1 -. Nucleotide sequences of primers used in this study.....74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – Resíduos aminoacídicos

ALFs – Fatores anti-lipopolissacarídeos

ALFs-like – Peptídeos relacionados a ALFs

ALFs-3cys - Peptídeos relacionados a ALFs contendo três resíduos de cisteína

ALFs-4cys - Peptídeos relacionados a ALFs contendo quatro resíduos de cisteína

AMPs – Peptídeos antimicrobianos

cDNA – DNA complementar

CFU – Unidades formadoras de colônia

Cq – Ciclo de quantificação

dNTPs - Deoxinucleotídeos trifosfatados

DAMPs – Padrões moleculares associados a perigo

DO – Densidade óptica

EST – *Expressed Sequence Tags*

FIC - Concentração inibitória fracionária

LPS – Lipopolissacarídeo

LTA – Ácido lipoteicóico

MAS – Solução de Alsever Modificada

MBC – Concentração bactericida mínima

MIC – Concentração inibitória mínima

MM – Massa molecular

M/PAMPs - Padrões moleculares associados a microrganismos/patógenos

ONPG - orto-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDB – *Protein Data Bank*

pI – Ponto isoelétrico teórico

RT-PCR – Transcrição reversa seguida de PCR

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

TSA – *Transcriptome Shotgun Assembly*

WGS – *Whole Genome Shotgun*

WSSV – Vírus da Síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. CAPÍTULO I: Revisão sobre peptídeos antimicrobianos em crustáceos.....	25
1. Introduction	28
2. A brief history of the research on crustacean AMPs	30
3. Widely distributed crustacean AMPs	32
3.1. Crustins.....	33
3.2. Anti-lipopolysaccharide factors (ALFs).....	36
4. Taxonomically-restricted crustacean AMPs.....	38
4.1. Dendrobranchiata (penaeid shrimp)	38
4.1.1. Penaeidins.....	38
4.1.2. Stylicins	40
4.2. Pleocyemata (crayfish, palaemonids, crabs, lobsters)	41
4.2.1. Crab proline-rich AMPs (PR-AMPs)	42
4.2.2. Crab glycine-rich AMPs (GR-AMPs).....	42
4.2.3. Arasins	44
4.2.4. Hyastatins	44
4.2.5. Astacidins	45
4.2.6. Panusins (β -defensin-like peptides).....	46
4.2.7. Paralithocins	47
4.3. AMPs from nondecapod crustaceans	47
5. Other antimicrobial-related molecules and unconventional AMPs.....	48
6. Essential role of AMPs in crustacean immunity and in host-microbe interactions.....	49
7. Conclusions	52
References	53

Supplementary information	63
4.CAPÍTULO II: Novos fatores anti-lipopolissacarídeos em camarões peneídeos.....	68
4.CAPÍTULO II - SEÇÃO A: Diversidade molecular e funcional de ALFs de camarões peneídeos.....	69
1. Introduction	71
2. Materials and Methods	72
2.1. Database Searches and Phylogenetic Reconstructions	72
2.2. Animals and Tissue Collection.....	73
2.3. Experimental Infections.....	73
2.4. Semiquantitative RT-PCR Analysis for Tissue Distribution of Gene Expression	73
2.5. Fluorescence-Based Reverse Transcription Real-Time Quantitative PCR	74
2.6. Peptide Synthesis, Oxidation and Characterization.....	75
2.7. Antibacterial and Antifungal Assays.....	76
3. Results.....	76
3.1. ALFs from Penaeid Shrimp Comprise a Diverse Family Composed of Seven Members.....	76
3.2. ALF Sequence Diversity Is Gene-Encoded.....	78
3.3. ALFs Evolved from Gene Duplication Events before Shrimp Speciation.....	79
3.4. ALFs Are All Expressed in Individual Shrimps and Differentially Modulated in Response to Tissue Damage	81
3.5. Some ALF Genes Are Transcribed Early in Shrimp Development, while Others Are Mainly Expressed in Juveniles.....	83
3.6. Sequence Diversity of Shrimp ALFs Results in Distinct Antimicrobial Properties.....	84
4. Discussion.....	86
5. Conclusions	89
References.....	90

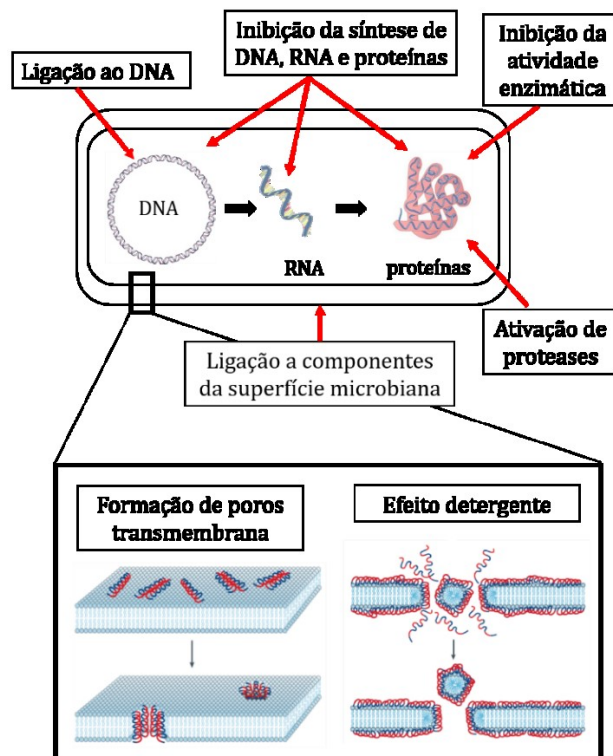
4. CAPÍTULO II - SEÇÃO B: Identificação e caracterização molecular e transcricional de <i>ALFs-like</i> em camarões peneídeos	92
1. Introdução	92
2. Materiais e Métodos	92
2.1. Análises <i>in silico</i>	92
2.2. Animais.....	93
2.3. Coleta de tecidos.....	94
2.4. Infecções experimentais	94
2.5. Extração de RNA e síntese de cDNA	95
2.6. Transcrição Reversa seguida de PCR convencional (RT-PCR).....	96
2.7. Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	96
3. Resultados.....	97
3.1. Diversidade molecular de <i>ALFs-like</i>	97
3.2. Expressão gênica de <i>ALFs-like</i>	103
4. Discussão	106
Referências.....	108
5. CAPÍTULO III: Potencial biotecnológico de peptídeos derivados de ALFs	111
1. Introdução	112
2. Materiais e Métodos	112
2.1. Síntese química de peptídeos e dicroísmo circular.....	112
2.2. Testes antimicrobianos	113
2.2.1. Microrganismos	113
2.2.2. Testes antibacterianos.....	114
2.2.3 Testes de atividade antimicrobiana em sinergia	115
2.3. Ensaio de permeabilidade de membrana.....	116
2.4. Ensaio de citotoxicidade	116
3. Resultados.....	117

3.1. Estrutura secundária dos peptídeos derivados de ALFs	117
3.2. Espectro de atividade antibacteriana de peptídeos derivados de ALFs.....	118
3.3. Ensaio de permeabilidade de membrana bacteriana.....	120
3.4. Atividade sinérgica de peptídeos sintéticos.....	120
3.5. Efeito citotóxico de peptídeos sintéticos	121
4. Discussão	122
Referências	124
6. DISCUSSÃO GERAL	127
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	133
7.1. Conclusão	133
7.2. Perspectivas	133
REFERÊNCIAS	134
APÊNDICE	140
ANEXOS.....	142

1. INTRODUÇÃO GERAL

Peptídeos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*) são moléculas efetoras associadas ao sistema imune inato e que apresentam diferentes funções imunes (HANCOCK; HANEY; GILL, 2016), sendo a atividade antimicrobiana a mais reconhecida. Essas moléculas compõem um grupo polifilético e são amplamente encontradas em organismos dos diferentes Reinos. A partir da identificação, na década de 80, dos primeiros AMPs na hemolinfa da mariposa *Hyalophora cecropia* (STEINER *et al.*, 1981), uma série de moléculas análogas foram descritas, revelando uma grande diversidade estrutural e funcional. Inicialmente, os AMPs foram caracterizados como pequenos peptídeos (<10 kDa) anfipáticos e catiônicos (BULET; STOCKLIN; MENIN, 2004). No entanto, essa definição passou a não contemplar toda a diversidade encontrada, dado que AMPs com caráter aniônico e de diferentes tamanhos também têm sido amplamente caracterizados (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). O mecanismo de ação dos AMPs é bastante diverso (Figura 1) e está relacionado essencialmente à composição aminoacídica e à estrutura tridimensional da molécula.

Figura 1 – Principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos.



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

Alguns AMPs atuam diretamente na membrana celular dos microrganismos por interações eletrostáticas com os fosfolipídios aniônicos, causando a sua desestabilização (BROGDEN, 2005). Essas moléculas também podem inserir-se na bicamada fosfolipídica levando à formação de poros e, conseqüentemente, ao extravasamento do conteúdo intracelular (BROGDEN, 2005). Outros AMPs podem, ainda, ligar-se a componentes da superfície microbiana ou serem interiorizados, inibindo vias metabólicas intracelulares essenciais ao microrganismo (BROGDEN, 2005; WILMES *et al.*, 2011).

O uso indiscriminado de antibióticos tem propiciado o surgimento e à seleção de bactérias resistentes aos antibióticos convencionalmente utilizados, representando assim um sério problema para a saúde pública (MCKENNA, 2013; MAGANA *et al.*, 2020). Bactérias multirresistentes ameaçam o sucesso de tratamentos baseados em antibióticos convencionais e têm sido cada vez mais associadas a severas infecções hospitalares (MAGANA *et al.*, 2020). Portanto, o desenvolvimento de novos antibióticos é de suma importância e vem despontando como uma das prioridades do setor farmacêutico. Nesse cenário, devido à atividade rápida e eficiente contra um amplo espectro de microrganismos, os AMPs destacam-se por serem moléculas com alto potencial biotecnológico para esta demanda (LEWIES *et al.*, 2019; MAGANA *et al.*, 2020). O ambiente marinho é composto por uma grande diversidade de microrganismos, sendo esperado que animais adaptados a sobreviver nesse ambiente apresentem um arsenal diverso de moléculas que atuem nas respostas de defesa. Dessa maneira, esses animais representam um interessante modelo de estudo para a identificação de novos AMPs com amplo espectro de atividade antimicrobiana (CHOUDHARY *et al.*, 2017).

O cultivo de crustáceos, em especial de camarões peneídeos, é uma prática importante em países do sudeste asiático e das Américas (FAO, 2020). O Brasil é o décimo maior produtor mundial, produzindo 54,3 mil toneladas de camarões em 2019, sendo a região Nordeste a principal responsável pela produção (IBGE, 2019; FAO, 2020). A espécie mais cultivada no mundo é o camarão peneídeo *Litopenaeus vannamei* devido às suas excelentes características zootécnicas, incluindo alta taxa de crescimento, alta fecundidade, tolerância à alta densidade de estocagem, a salinidades extremas, a baixas temperaturas e resistentes ao manejo em cativeiro (BRIGGS *et al.*, 2004). Um dos principais desafios para o cultivo desses animais é o controle de doenças infecciosas, responsáveis por altas taxas de mortalidade nos cultivos e perdas econômicas aos produtores (ASCHE *et al.*, 2020). Os patógenos de maior destaque nos cultivos são o vírus causador da Síndrome da Mancha Branca (WSSV, *White Spot Syndrome Virus*) e as bactérias do gênero *Vibrio* (FLEGEL, 2019). Em janeiro de 2005, o aparecimento do WSSV

em cultivos de Santa Catarina levou a altas taxas de mortalidade de camarões e, conseqüentemente, ao fechamento da maioria das fazendas produtoras do estado (SEIFFERT; WINCLERK; MAGGIONI, 2005). Em função do impacto causado por doenças infecciosas no cultivo desses animais, o estudo de AMPs de crustáceos cultiváveis tem avançado não apenas para identificar moléculas com potencial biotecnológico, mas também para contribuir no entendimento das respostas de defesa desses animais visando a seleção de animais mais resistentes a patógenos.

Em crustáceos, os primeiros AMPs foram purificados na década de 90 a partir da hemolinfa de caranguejos (6.5-kDa *bac-like* - SCHNAPP *et al.*, 1996) e camarões peneídeos (peneidinas - DESTOUMIEUX *et al.*, 1997). Desde então, diferentes famílias de AMPs foram identificadas, principalmente em espécies cultiváveis como os camarões peneídeos, devido ao seu interesse econômico (ROSA; BARRACCO, 2010; SMITH; DYRYNDA 2015). Atualmente, são reconhecidas doze famílias distintas de AMPs em crustáceos: crustinas, fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs), peneidinas, stylicinas, *proline-rich AMPs* (PR-AMPs), *glycine-rich AMPs* (GR-AMPs), arasinas, hyastatinas, astacidinas, panusinas, paralithocinas e armadillidinas. A descrição detalhada de cada família encontra-se no **Capítulo I**. Com exceção das crustinas e dos ALFs, a maioria das famílias de AMPs está restrita a táxons específicos. Por exemplo, em camarões peneídeos (subordem Dendrobranchiata), quatro famílias de AMPs foram descritas: as peneidinas e as stylicinas, que são encontradas exclusivamente nesse grupo, e as crustinas e os ALFs, que são amplamente encontradas nos diferentes táxons de crustáceos. Além dessas doze famílias, peptídeos cuja função principal está associada a outros processos biológicos, mas que apresentam atividade antimicrobiana, e AMPs derivados da clivagem de outras proteínas também têm sido identificados em crustáceos (ex. lisozimas e peptídeos derivados da hemocianina) (KULKARNI *et al.*, 2021).

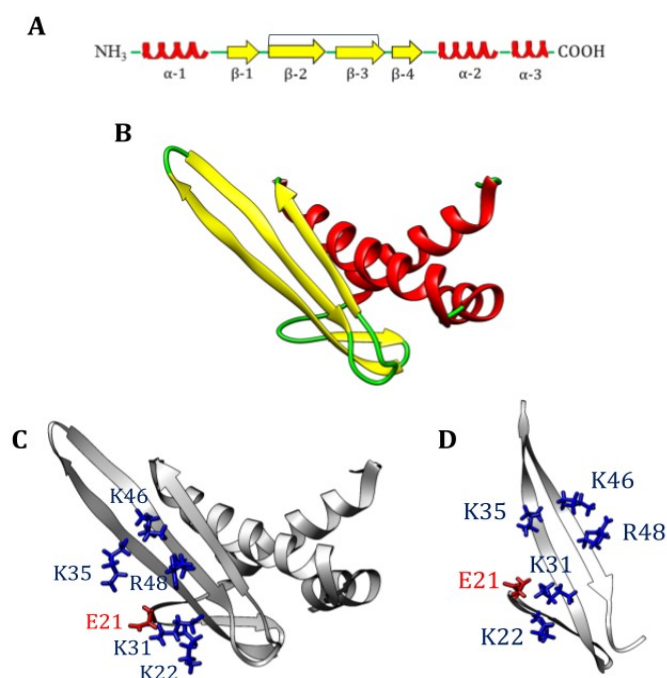
Historicamente, os ALFs foram inicialmente isolados da hemolinfa dos limulídeos *Limulus polyphemus* e *Tachypleus tridentatus*, na década de 80 (TANAKA *et al.*, 1982). Esses quelicerados marinhos apresentam um sistema de coagulação bastante sensível a pequenas concentrações de lipopolissacarídeos (LPS) da parede de bactérias Gram-negativas. Ao reconhecer os LPS, os receptores celulares dos hemócitos ativam uma cascata de sinalização que causa a liberação de grânulos contendo uma série de moléculas imunofetoras. Essas moléculas atuam tanto no processo de coagulação da hemolinfa, para contenção da dispersão dos patógenos, assim como apresentam atividade antimicrobiana (IWANAGA *et al.*, 1998). Quando o lisado de hemócitos dos limulídeos foi analisado por TANAKA e colaboradores

(1982) um peptídeo de aproximadamente 10 kDa foi encontrado sendo capaz de inibir a cascata de coagulação da hemolinfa do limulus, o qual foi nomeada de fator “anti-LPS” ou ALF. Posteriormente, testes de atividade biológica evidenciaram uma potente atividade antimicrobiana desse peptídeo contra bactérias Gram-negativas (MORITA *et al.*, 1985).

Em crustáceos, os primeiros ALFs foram identificados no começo dos anos 2000 em duas espécies de camarões, *Litopenaeus setiferus* (GROSS *et al.*, 2001) e *Penaeus monodon* (SUPUNGUL *et al.*, 2002), por meio da construção de bibliotecas de genes expressos em hemócitos. Posteriormente, com o avanço das técnicas de biologia molecular, novos ALFs foram identificados em outras espécies de camarões, além de lagostas, caranguejos e lagostins (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). A maioria dos ALFs caracterizados até o momento foi identificada em espécies de interesse comercial e poucos estudos analisaram a diversidade desses AMPs em outras ordens de Malacostraca, como Amphipoda (LAI; ABOOBAKER, 2017) e Isopoda (BECKING *et al.*, 2020). Em camarões peneídeos, os ALFs são classificados em cinco grupos distintos (Grupos A-E), apresentando diferentes assinaturas aminoacídicas e características bioquímicas (PONPATREEP *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2015). Além das diferenças em tamanho e massa molecular, os ALFs de camarões peneídeos apresentam pontos isoelétricos contrastantes: enquanto os Grupos B e C são catiônicos, os Grupos A, D e E são aniônicos (ROSA *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2015).

Em geral, as sequências de ALFs apresentam um peptídeo sinal seguido de um peptídeo maduro de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos. Até o momento, duas estruturas tridimensionais de ALFs foram resolvidas: a do L-ALF de *L. polyphemus* por cristalografia (HOESS *et al.*, 1993) e a de ALFPm3 de *P. monodon* (ALF do Grupo B) por ressonância magnética nuclear (YANG *et al.*, 2009). Ambas estruturas apresentam três α -hélices e quatro folhas- β , demonstrando que a estrutura tridimensional dos ALFs é conservada nesses grupos taxonômicos (Figura 2). O peptídeo maduro dos ALFs possui uma região N-terminal hidrofóbica e dois resíduos conservados de cisteína, cuja ligação dissulfeto determina a região associada à ligação a LPS (Figura 2). Essa região assume um formato de grampo (β -hairpin) e normalmente é composta por resíduos de aminoácidos catiônicos (lisina/arginina) que interagem com as cargas negativas do lipídeo A do LPS (HOESS *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 2009) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura de ALFPm3 do camarão *Penaeus monodon*.



A. Representação esquemática da estrutura secundária de ALFPm3, composta por três α -hélices (em vermelho) e quatro folhas- β (em amarelo). A ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína está representada pela ligação entre o começo da folha β -2 e final da folha β -3. **B.** Estrutura 3D de ALFPm3 resolvida por RMN (PDB:2JOB - Yang *et al.*, 2009). **C.** Estrutura 3D de ALFPm3 evidenciando os resíduos aminoacídicos envolvidos na ligação ao LPS (Yang *et al.*, 2009). **D.** Representação do β -hairpin evidenciando os resíduos aminoacídicos envolvidos na ligação ao LPS. Em azul estão representados resíduos aminoacídicos carregados positivamente e em vermelho resíduos aminoacídicos carregados negativamente.

Estudos *in vitro* comprovaram que peptídeos derivados do β -hairpin apresentam atividade antimicrobiana similar à molécula inteira (NAGOSHI *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2015). YANG e colaboradores (2009) propuseram o envolvimento de seis resíduos aminoacídicos carregados na ligação de ALFPm3 ao lipídeo A de LPS, quatro deles encontrados na região entre cisteínas e dois na região flanqueadora, reforçando a importância dessa região nas sequências de ALFs (Figura 2). Esses resíduos não são conservados nos diferentes grupos de ALFs encontrados em crustáceos, podendo resultar na divergência funcional observada nessa família (ROSA *et al.*, 2013). A perda desses resíduos nos ALFs do Grupo D resulta na redução da afinidade desses peptídeos ao LPS e, conseqüentemente, a uma menor atividade antimicrobiana (ROSA *et al.*, 2013). Em contrapartida, substituições de resíduos não carregados por resíduos catiônicos levam a um aumento na atividade antimicrobiana de peptídeos derivados de ALFs (GUO *et al.*, 2014). Além de ligarem-se ao lipídeo A dos LPS de bactérias Gram-negativas, alguns ALFs são capazes de ligarem-se ao ácido lipoteicoico (LTA) de bactérias Gram-positivas (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008) e às

β -glicanas dos fungos (SUN *et al.*, 2011), conferindo assim um amplo espectro de atividade antimicrobiana a essa família de AMPs.

Os ALFs são expressos e estocados nos hemócitos, que representam as células imunoefetoras dos crustáceos, sendo liberados no plasma mediante estímulos microbianos (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2015). Por outro lado, níveis elevados de transcritos de alguns ALFs foram identificados em outros tecidos, como brânquias (LIU *et al.*, 2013), órgão linfoide (LI *et al.*, 2014), intestino e hepatopâncreas (ZHU *et al.*, 2019), estando praticamente ausentes em hemócitos circulantes. Devido ao sistema circulatório dos crustáceos ser semi-aberto ou aberto, não está claro se esse padrão de expressão está relacionado a populações hemocitárias específicas infiltradas ou residentes nesses tecidos ou pela contribuição de outros tecidos na expressão de ALFs. Assim como observado em outros AMPs, esses genes são regulados por fatores de transcrição da família NF- κ B/Rel vinculados às vias de sinalização Toll, IMD e JAK/STAT (KAMSAENG *et al.*, 2017; NIU *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2017). A expressão de ALFs é induzida frente a diferentes patógenos (vírus, bactérias e fungos) e também frente a danos teciduais (PONPRATEEP *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2013; GONCALVES *et al.*, 2014). Esses peptídeos apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana, apresentando atividade contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2005; THARNTADA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2015). Além da defesa contra microrganismos patogênicos, os ALFs apresentam um papel crucial na manutenção da microbiota (PONPPRATEEP *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014). Em *P. monodon*, o silenciamento pós-transcricional de ALFs do Grupo B levou ao aumento de bactérias na hemolinfa e, conseqüentemente, à morte dos animais (PONPRATEEP *et al.*, 2012).

Os ALFs representam uma família multigênica altamente diversa e com o maior espectro de atividade antimicrobiana em relação aos outros AMPs descritos em crustáceos. Genes relacionados a ALFs parecem ter divergido de maneira distinta em diferentes táxons de crustáceos, sugerindo novas funções para essas moléculas. Além da atividade antimicrobiana direta, o envolvimento de ALFs na regulação da microbiota (PONPPRATEEP *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014), nas respostas de defesa contra patógenos (de la VEGA *et al.*, 2008; PONPRATEEP *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2013; GONCALVES *et al.*, 2014) e durante o desenvolvimento embrionário (QUISPE *et al.*, 2016) também já foram sido descritos. Ademais, peptídeos derivados do β -*hairpin* apresentam atividade biológica similar à molécula inteira, facilitando a produção e aplicação de peptídeos derivados de ALFs. Devido a essas características, os ALFs representam um promissor alvo de estudos a fim de identificar e

caracterizar moléculas com aplicações em sanidade aquícola e com potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos antibióticos derivados de AMPs. Diante deste contexto, o presente estudo propôs investigar e caracterizar a diversidade molecular de ALFs de camarões peneídeos, utilizando como modelo de estudo a espécie de camarão mais cultivada no mundo, *Litopenaeus vannamei*. Além disso, buscou-se avaliar as implicações biológicas dessa diversidade e o potencial uso biotecnológico de peptídeos derivados de novos ALFs identificados.

O presente documento está dividido em três capítulos, contemplando as atividades realizadas. O **Capítulo I** se refere a um artigo de revisão, que foi redigido em comemoração aos 25 anos da descoberta dos AMPs de crustáceos. Essa revisão detalha a diversidade molecular e funcional dessas moléculas e enfatiza a sua participação como efetores imunológicos em crustáceos e nas interações microrganismo-hospedeiro. O **Capítulo II** se refere ao artigo de identificação e caracterização de novos membros de ALFs em camarões peneídeos (**Seção A**). Nesse artigo, foi explorada a diversidade molecular e a divergência funcional de ALFs em camarões peneídeos. No **Capítulo II** também foi realizada a identificação, caracterização molecular e avaliação do perfil de expressão de peptídeos relacionados a ALFs (*ALFs-like*) contendo três ou quatro resíduos de cisteína (**Seção B**). O **Capítulo III** refere-se à avaliação do potencial biotecnológico de peptídeos sintéticos derivados de ALFs como novos antimicrobianos.

Além disso, os trabalhos produzidos durante o período sanduíche encontram-se disponíveis no **Apêndice I** e **Anexo 4**. O estágio doutoral sanduíche foi realizado no Instituto Karolinska (Estocolmo, Suécia), no âmbito do Programa Institucional de Internacionalização da CAPES (CAPES PrInt) e do Programa *Joint Brazilian-Swedish Research Collaboration* (STINT) e ocorreu entre os meses de fevereiro e dezembro de 2020. As atividades foram realizadas sob orientação do professor Björn Andersson, que coordena um grupo de pesquisa referência em genômica comparativa sobre a biologia de protozoários e vírus, buscando identificar novos alvos de tratamento, portanto, não associado ao estudo com os AMPs. Durante o estágio doutoral sanduíche, buscou-se o desenvolvimento profissional em bioinformática, além do estabelecimento de parcerias entre os laboratórios brasileiro e sueco. A fim de atingir esse objetivo projetos com análise de dados de transcrito e genômica comparativa foram realizados. Esses projetos resultaram em um artigo como primeiro autor, submetido à revista “*eLife*” (ISSN: 2050-084X) (**Apêndice I**) e um artigo em coautoria publicado na revista “*Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*” (ISSN: 2235-2988) (**Anexo 4**).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a diversidade molecular e funcional de fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) em camarões peneídeos e avaliar o seu potencial biotecnológico, utilizando como modelo a espécie *Litopenaeus vannamei*.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Caracterizar a diversidade molecular de ALFs em camarões peneídeos;
- 2.2.2. Determinar a distribuição da expressão gênica em diferentes tecidos de animais juvenis;
- 2.2.3. Caracterizar o perfil transcricional de ALFs frente a infecções experimentais por patógenos de interesse aquícola;
- 2.2.4. Quantificar a expressão de ALFs ao longo do desenvolvimento embrionário;
- 2.2.5. Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas de novos ALFs;
- 2.2.6. Avaliar o mecanismo de ação de peptídeos derivados de ALFs;
- 2.2.7. Avaliar o efeito sinérgico de diferentes peptídeos derivados de ALFs;
- 2.2.8. Avaliar o efeito citotóxico de peptídeos derivados de ALFs em células de mamíferos.

3. CAPÍTULO I: Revisão sobre peptídeos antimicrobianos em crustáceos

O primeiro capítulo desta tese se refere à uma revisão que celebra os 25 anos da descoberta dos primeiros AMPs em crustáceos. Esse capítulo serve como estado da arte da tese, elencando a diversidade molecular e funcional dos AMPs e o seu papel nas respostas imunológicas e nas interações microrganismo-hospedeiro em crustáceos. Essa revisão foi publicada na revista “*Reviews in Aquaculture*” (ISSN:1753-5131).

Review article

On the silver jubilee of crustacean antimicrobial peptides

Gabriel Machado Matos and Rafael Diego Rosa*

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

*Corresponding author.

E-mail address: rafael.d.rosa@ufsc.br. Phone: +55 48 3721 6163

Running title: Antimicrobial peptides from crustaceans

DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12614>

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are widely distributed effector molecules that provide a first line of defence for organisms that lack adaptive immunity, such as crustaceans. They also represent *bioactive* molecules with great potential as therapeutic agents in aquaculture and biomedicine. Over the last years, an intensive research effort has been devoted to the identification and characterisation of antimicrobials in crustaceans resulting in the recognition of twelve gene-encoded AMP families to date. In addition to classical linear and multi-domain AMPs, crustaceans also rely on the production of unconventional ones, such as lysozymes and AMPs encrypted in large proteins carrying nonimmune functions. Besides their molecular and functional diversity, crustaceans have a particular AMP repertoire usually composed of diverse multigene families of taxonomically-restricted peptides/polypeptides. In fact, only a few families of AMPs are shared between crustaceans and their close arthropod relatives. This review celebrates the silver jubilee of the discovery of the first crustacean AMPs and presents an updated and comprehensive overview in terms of structure, diversity and biological properties, emphasising their role in immune responses and in host-microbe interactions. We also discuss the main progress achieved so far and major challenges remaining.

Keywords: anti-lipopolysaccharide factor (ALF), crustin, decapod, host defence peptide (HDP), invertebrate immunity, penaeidin.

1. Introduction

Crustaceans are one of the largest and most diverse animal groups on Earth in terms of species, abundance and spatial distribution. They colonised all aquatic habitats from hypersaline to freshwater ecosystems as well as some semiterrestrial and terrestrial habitats. In their natural environment, crustaceans are exposed to abundant and changing microbial communities, which include both commensals and opportunistic pathogens. The crustacean body surfaces (including many internal organs, such as the haemolymph and the gastrointestinal tract) harbour a dense and diverse natural microbiota.¹ While microorganisms hosted by crustaceans help maintain homeostasis, under stressful conditions some can become highly pathogenic. It is now widely recognised that environmental stressors, which can be of anthropogenic origin, play a key role in crustacean-microbe interactions.²

Similar to other invertebrates, crustaceans defend themselves by a combination of nonadaptive antimicrobial and antiviral responses mediated mainly by haemocytes, the circulating immunocompetent cells,³ but also by epithelial cells lining different organs, such as gills and intestines.^{4,5} The recognition of conserved molecular patterns present on the cell surface of microbes by host pattern recognition sensors can activate different haemocyte immune responses, including phagocytosis and the formation of nodules and capsules as well as the release of nucleic acid extracellular traps.^{3,6} Crustacean haemocytes also mediate important humoral responses (*e.g.*, haemolymph clotting and melanin synthesis by the prophenoloxidase system) and the production of cytotoxic free radicals and antimicrobial peptides.^{3,7}

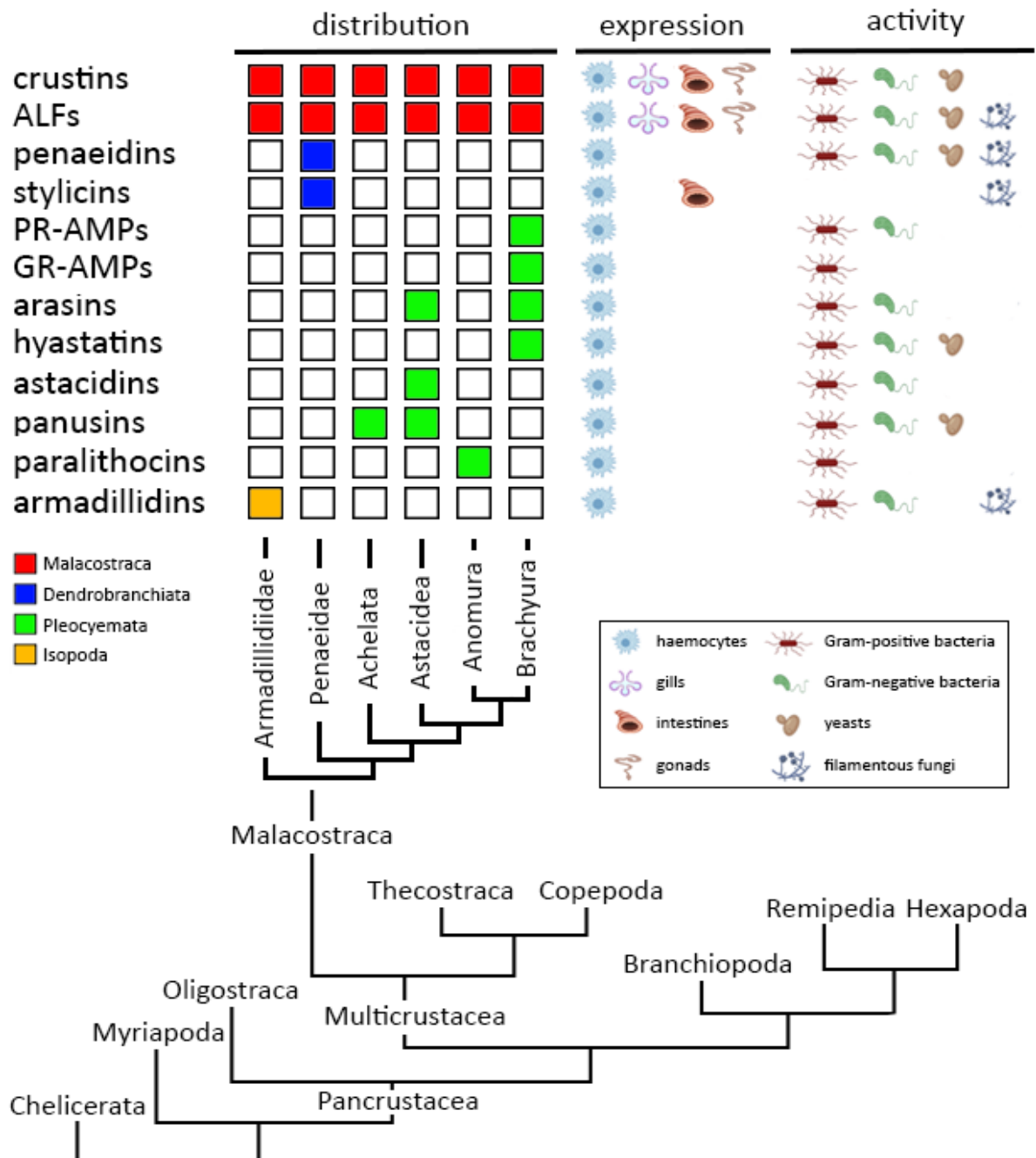
Antimicrobial peptides (AMPs) are natural defence molecules found in virtually all kingdoms of life, from single-celled microbes to mammals. Classically, they are described as gene-encoded peptides with less than 10 kDa, usually cationic, which selectively target the negatively charged membranes of microbes.⁸ In addition to classical cationic antimicrobial peptides (CAMPs), the recent classification systems also embrace anionic antimicrobial peptides (AAMPs), polypeptides larger than 10 kDa and AMPs encrypted in large proteins carrying nonimmune functions.⁹ Based on their amino acid composition, structure and biochemical properties, they are often divided into different classes or families.^{9,10} AMPs are most effective against bacteria (both Gram-positives and Gram-negatives), yeasts and filamentous fungi and, to a lesser extent, against protozoans, parasites and enveloped viruses.¹¹ More than antimicrobials, some AMPs are multifunctional molecules performing a wide range of both immune and nonimmune functions, therefore, being considered as ‘host defence

peptides' (HDP). As crustaceans rely only on innate immune reactions for their defence, these molecules play a critical role in host-microbe interactions and in warding off invading pathogens.⁷

Since the discovery of the first crustacean AMPs,^{12,13} several gene-encoded AMP families and other antimicrobial-related molecules (*e.g.*, lysozymes, multifunctional proteins and nonribosomally synthesised AMPs encrypted in large proteins) have been identified and characterised, especially in decapods due to their commercial importance. To the best of our knowledge, twelve gene-encoded AMP families are currently recognised in crustaceans (Figure 1; Supplementary Table 1). Except for two families (crustins and anti-lipopolysaccharide factors), the vast majority of AMPs from crustaceans are taxonomically restricted (Figure 1). Another important feature is that most of these families are multigenic and comprise multiple structural domains.⁷ Besides, unlike most AMPs from insects that are produced by the fat body and secreted to haemolymph in response to infections,¹⁴ crustacean AMPs are often constitutively synthesised and stored in cytoplasmic granules of specific haemocyte populations.¹⁵⁻¹⁷ With rare exceptions, the presence of most AMPs in other organs such as the hepatopancreas (a digestive gland comparable to the liver in vertebrates) is often the result of the migratory behaviour displayed by circulating haemocytes in crustacean tissues.⁴

Important advances have been made since the publication of the first comprehensive review article on crustacean AMPs eleven years ago.⁷ Indeed, the development and application of -omics technologies, new bioinformatics tools and both reverse and forward genetic approaches using RNA interference (RNAi)-mediated posttranscriptional gene silencing (PTGS) have profoundly revolutionised this scientific field in an unprecedented way. Through this updated review, we provide a complete overview of recent progress achieved not only in the identification of novel AMP families, but also in the understanding of their involvement in both immune and nonimmune functions and in crustacean-microbe interactions.

Figure 1. Antimicrobial peptides (AMPs) from crustaceans.



Schematic representation of a simplified phylogeny of crustaceans, indicating the taxonomic distribution, the sites of expression and the antimicrobial spectrum of the twelve gene-encoded AMP families currently recognised in malacostracans.

2. A brief history of the research on crustacean AMPs

The outset of the history of crustacean AMPs began in the mid-90s of the last century with the concomitant identification of two gene-encoded AMPs in the haemolymph of brachyuran crabs (6.5-kDa bac-like peptide)¹² and penaeid shrimp (penaeidins).¹³ These pioneering studies opened up a new and large avenue in this research field that allowed a better

understanding of the immune system of crustaceans. Great advances in the study of crustacean AMPs were in part possible thanks to two international collaborative networks headed by the French woman researcher Evelyne Bachère: ‘*Shrimp Immunity & Disease Control*’ (INCO-DC/IC18CT970209; countries: Brazil, Colombia, Ecuador, France, French Polynesia, Mexico, Portugal, Sweden and Thailand; 1997-2000)¹⁸ and ‘*IMMUNAQUA*’ (INCO-DC/ICA4-CT-2001-10023; countries: Belgium, Brazil, Chile, China, France and Thailand; 2002-2005).¹⁹ Of important note, this research field has been specially conducted by women from different parts of the Globe: Anchalee Tassanakajon (Thailand), Christine Braquart-Varnier (France), Delphine Destoumieux-Garzón (France), Evelyne Bachère (France), Irene Söderhäll (Sweden), Klara Stensvåg (Norway), Kunlaya Somboonwiwat (Thailand), Margherita Anna Barracco (Brazil), Pikul Jiravanichpaisal (Thailand), Premruethai Supungul (Thailand), Rosamma Philip (India), Swapna Antony (India), Valerie Smith (Scotland, UK) and Vivian Montero-Alejo (Cuba). They and other very talented women scientists not cited here have inspired generations of new researchers.

The timeline presented in Figure 2 illustrates the chronological extent of the main discoveries concerning crustacean AMPs. Based on amino acid composition and structure, Rosa and Barracco⁷ initially classified the 15 known crustacean AMPs into four main groups: (1) single-domain linear α -helical AMPs and peptides enriched in certain amino acids (6.5-kDa bac-like peptide, callinectin, astacidin-2, homarin and armadillidin), (2) single-domain peptides containing cysteine residues engaged in disulphide bonds (anti-lipopolysaccharide factors or ALFs, scygonadins and defensins), (3) multi-domain or chimeric AMPs (penaeidins, crustins, hyastatins, arasins and stylicins) and (4) unconventional AMPs (haemocyanin-derived peptides and histone-derived peptides).

However, recent studies have shown that some peptides are actually members of previously described AMP families. For instance, while homarin²⁰ has recently been categorised as a β -defensin-like peptide of the panusin family¹⁶, the callinectin antibacterial peptide²¹ has been recognised as a member of the arasin family.²² Besides, based on phylogenetic reconstructions, scygonadins²³ are now suggested to be polypeptides derived from an ancestor ALF-related gene in crabs.²⁴ On the other hand, the CMCC-1 peptide²⁵ and the glycine-rich peptide procambarin²⁶ were only partially characterised and, up to now, they cannot be considered as authentic crustacean AMPs.

Figure 2. The crustacean AMP timeline.

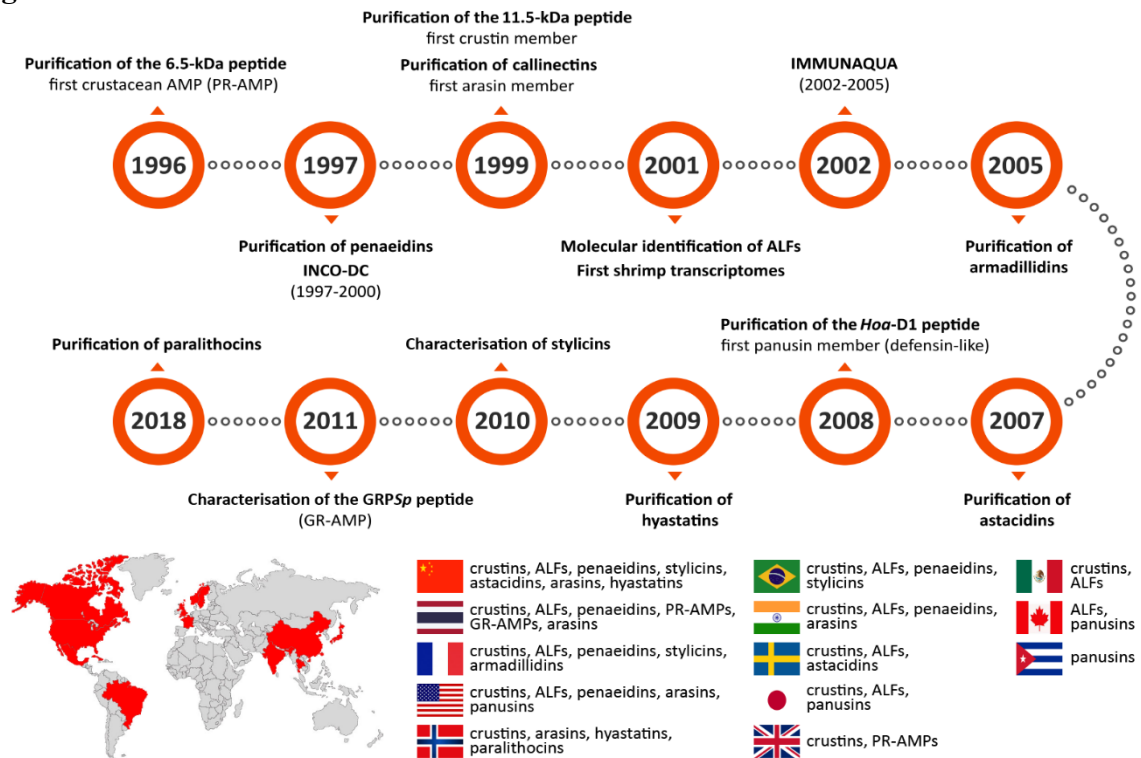


Illustration of the main events related to the identification of crustacean AMPs.

Thus, taking into account all these scientific evidences, twelve gene-encoded AMP families are now recognised in crustaceans: crustins, anti-lipopolysaccharide factors (including crab scygonadins), penaeidins, stylicins, crab proline-rich AMPs (including the 6.5-kDa bac-like peptide), crab glycine-rich AMPs, arasins (including the callinectin peptide), hyastatins, astacidins, panusins (including the homarin peptide), paralithocins and armadillidins (Figure 1). In this review, we organised the crustacean gene-encoded AMPs based on their taxonomic distribution: (i) widely-distributed and (ii) taxonomically-restricted AMPs. The nonribosomally synthesised AMPs are discussed with other crustacean antimicrobial-related molecules (see section 5).

3. Widely distributed crustacean AMPs

From all currently recognised gene-encoded AMPs, only crustins and ALFs appear to occur in most crustaceans (Figure 1). Besides their occurrence in malacostracan species, these two AMP families are also found in other arthropod groups: crustins are present in some insects from the order Hymenoptera (Arthropoda: Mandibulata: Insecta)²⁷ and ALFs are also produced by marine chelicerates (Arthropoda: Chelicerata: Merostomata).^{28,29} Curiously, the genome of the freshwater branchiopod *Daphnia pulex* (class Branchiopoda) showed to be devoid of

sequences encoding any of the twelve known crustacean AMP families.³⁰ In fact, the *D. pulex* genome lacks any previously known AMP sequence, suggesting that brachiopods have their own arsenal of AMPs. Up to now, it is not yet clear if both crustins and ALFs were lost during the evolution of the Branchiopoda (and other crustacean taxa) or if those genes emerged only in the Malacostraca lineage.

3.1. Crustins

Crustins were first purified from the haemocytes of the shore crab *Carcinus maenas* as a cationic 11.5-kDa antibacterial peptide with specific activity against Gram-positive marine or salt-tolerant bacteria.³¹ The 11.5-kDa peptide was then named as ‘carcinin’ after the genus *Carcinus*,³² but with the identification of homologue sequences in penaeid shrimp³³ the term ‘crustin’ was coined to name this AMP family in crustaceans. To date, the development of powerful deep sequencing technologies allowed the identification of crustin-like sequences in different malacostracan species (*e.g.*, amphipods, decapods and isopods) and even in some hymenopteran insects.²⁷

Crustin precursors are composed of a leader sequence followed by a disulphide-rich peptide/polypeptide containing a characteristic C-terminus whey acidic protein (WAP) domain (Figure 3A; Supplementary Figure 1). Crustins structure is likely to be composed of two motifs, a random coil N-terminus followed by a WAP domain displaying two β -sheets and an α -helix segment.^{34,35} The WAP motif is a 50-amino acid domain that holds eight cysteine residues in a conserved arrangement that forms a tightly packed structure folded by four disulphide bridges.³⁶ This three dimensional arrangement is also found in other proteins displaying different biological functions, from antimicrobial activity to proteinase inhibition and tissue differentiation.^{36,37}

Crustins are recognised as one of the most diverse gene-encoded AMPs found in crustaceans. Despite the systematic occurrence of a conserved C-terminus WAP domain, the N-terminus of crustins is highly variable in length and amino acid composition (Figure 3A). Based on the presence/absence of structural domains lying at the N-terminal region, crustins were initially classified into three main categories, referred as Types I to III.³⁴ Type I crustins (also known as ‘carcinins’) are characterised by the presence of four conserved cysteine residues (the ‘cysteine-rich region’) upstream to the C-terminus WAP domain. They occur mainly in Pleocyemata (*e.g.*, crabs, lobsters and crayfish), but some members were also reported in penaeid shrimp and isopods.^{38,39} Type II crustins are mainly present in penaeid shrimp

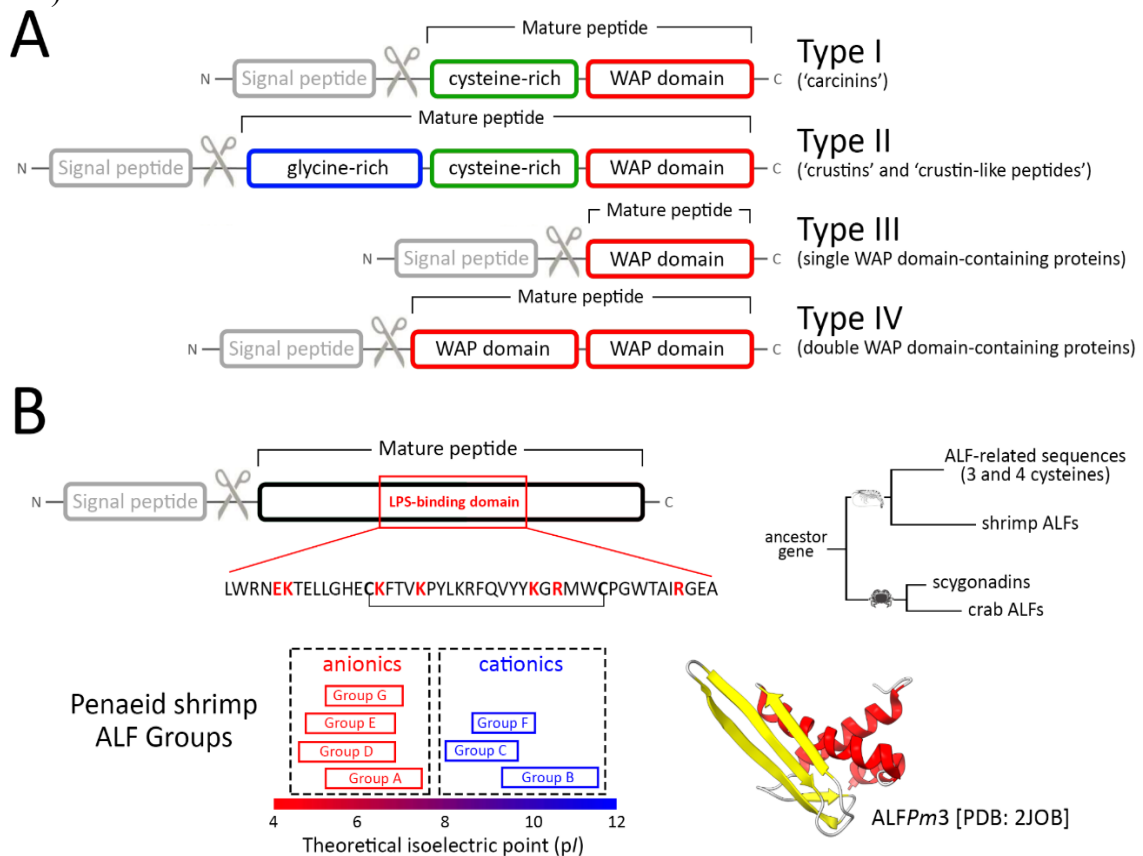
(Dendrobranchiata) and possess a hydrophobic region enriched in glycine residues (the ‘glycine-rich region’) ahead of the cysteine-rich domain also found in Type I crustins. Based on specific amino acid signatures, Type II crustins can be further subdivided into Type IIa (‘crustins’) and Type IIb (‘crustin-like peptides’).⁴⁰ Exceptionally, Type III crustins (also known as single WAP domain-containing proteins) are composed of a single WAP domain and may have a proline/arginine-rich region at the N-terminus.⁴¹ Currently, this classification system, widely accepted in the literature, also includes proteins containing two WAP domains exhibiting antimicrobial activity (Type IV or double WAP domain-containing proteins) and crustins from hymenopteran insects (Type V).

Remarkably, phylogenetic reconstructions indicate that while crustins from Types I, II and V form a monophyletic group, Type III and IV crustins (single and double WAP domain-containing proteins, respectively) belong to an external clade.^{34,37,42,43} To our knowledge, crustins are more than WAP domain-containing proteins (widely distributed in nature), but (poly)peptides that display a specific amino acid signature of twelve cysteine residues (four from the cysteine-rich region and eight from the WAP domain). Indeed, this arrangement of twelve conserved cysteine residues was previously termed as ‘crustin domain’. Zhao and Wang⁴² proposed a classification system based on the presence of the crustin domain and divided crustins into three groups: class I (corresponding to Type IIa crustins), class II (corresponding to Type IIb crustins) and carcinins (corresponding to Type I crustins). More recently, Vargas-Albores and Martínez-Porchas⁴³ proposed an alternative classification system based on specific features of the N-terminal glycine-rich region. It is important highlight that novel studies performing an exhaustive analysis of crustin diversity in crustaceans followed by a robust phylogenetic reconstruction are still necessary to establish a precise classification system and sheds light on the evolutionary history of this diverse AMP family.

Crustins are strong antibacterial peptides and are considered important crustacean immune effectors. Usually, Type I crustins are mainly active against Gram-positive bacteria and display weak activity against yeasts,^{6,44} while Type II crustins display a broader antibacterial spectrum against both Gram-positives and Gram-negatives.^{2,17} Comparatively, Type III and IV crustins display activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.⁶ Besides their direct antimicrobial function, crustins display agglutinating properties and can also bind to antimicrobial moieties, such as lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA).^{35,45,46} Additionally, Type I crustins seem to be accumulated in damaged tissues, indicating a probable role in tissue regeneration.⁴⁷

Crustins are mainly expressed in granular haemocytes and are released into the plasma in response to infections and tissue damage.^{45,47–49} Recently, it was demonstrated that a Type IIa crustin from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (*crusFpau*) is produced by specific granule-containing haemocyte subpopulations.¹⁷ On the other hand, high transcript levels of some crustin members have been observed in other organs than haemocytes, such as gills,^{40,50–52} stomach,^{51,53,54} intestine⁵⁴ and ovaries.⁴⁷ The regulation of the crustins genes seems to be mainly regulated by NF- κ B transcription factors activated by both Toll and IMD signalling pathways.^{35,52,55,56} Interestingly, the maternal contribution to the offspring of Type II crustins in penaeid shrimp^{40,57} and of Type I crustins in crabs⁴⁷ highlights the importance of these AMPs during crustacean development.

Figure 3. Widely distributed crustacean AMPs: crustins and anti-lipopolysaccharide factors (ALFs).



(A) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of the four crustin Types (I to IV) found in crustaceans: the glycine-rich region (blue), the cysteine-rich region (green) and the whey acidic protein (WAP) domain (red). (B) Schematic representation (not to scale) of ALF precursors indicating the LPS-binding domain. The seven charged residues involved in LPS-binding of the ALFPm3 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Yang et al., 2009) are highlighted in red. Diagram showing the diverse biochemical features displayed by the seven ALFs found in penaeid shrimp (Groups A to G). Threedimensional structure of ALFPm3 (PDB: 2JOB). Evolution of the ALF-related genes: while scygonadins probably diverged from an ancestor ALF-related gene in crabs, ALF-like sequences containing three or four cysteine residues evolved in penaeid shrimp.

3.2. Anti-lipopolysaccharide factors (ALFs)

Anti-lipopolysaccharide factors (ALFs or anti-LPS factors) are amphipathic peptides containing a central-hairpin structure able to bind to microbial surface components. ALFs were first identified in the marine chelicerates (horseshoe crabs) *Limulus polyphemus* and *Tachypleus tridentatus* as potent inhibitors of LPS-induced haemolymph clotting.^{28,29} Additionally, ALF activity against Gram-negative bacteria was further demonstrated, suggesting its role as multifunctional effectors in host response to infections.²⁹ The first crustacean ALF members were identified in the early 2000's by the analysis of haemocyte transcriptomes of two penaeid shrimp species, *Litopenaeus setiferus*⁵⁸ and *Penaeus monodon*.⁵⁹ Interestingly, while only one ALF variant was described in horseshoe crabs, crustaceans ALFs form a diverse and multigene family.

ALFs are encoded as precursor molecules composed of a leader sequence followed by a mature polypeptide with a highly hydrophobic N-terminal region and two conserved cysteine residues (Figure 3B). The three-dimensional structure of recombinant ALFs from *L. polyphemus* (rLALF)⁶⁰ and *P. monodon* (rALFPm3; PDB: 2JOB)⁶¹ was solved using X-ray and NMR spectroscopy strategies, respectively. Both structures consist of three α -helices, one at the N-terminus and two at the C-terminus, packed against a four-stranded β -sheet (Figure 3B). The two conserved cysteine residues stabilise a central β -hairpin (also known as 'LPS-binding domain' or LPS-BD) of 20 amino acid residues (Figure 3B; Supplementary Figure 1). This central β -hairpin is considered the core region for ALF biological activity. Interestingly, synthetic peptides derived from the central β -hairpin display antimicrobial activity and binding properties similar to the entire molecule.⁶²⁻⁶⁴ The mechanism of action of ALFs is intimately associated with their ability to bind to microbial moieties, such as LPS from Gram-negative bacteria and LTA from Gram-positive bacteria,⁶⁵ and β -glucans from fungi.⁶⁶ Seven charged amino acid residues located in the central β -hairpin and flanking β -strands have been proposed to be involved in LPS binding of rALFPm3⁶¹ (Figure 3B; Supplementary Figure 1). These charged residues are not conserved in all ALFs, which may contribute to the functional divergence observed for this AMP family.^{24,64}

ALFs from penaeid shrimp are classified into seven Groups (Groups A to G) with distinct amino acid signatures and biochemical features.²⁴ Besides their differences in size and molecular weight, shrimp ALFs also display contrasting electrostatic characteristics. For instance, ALFs from Groups B, C and F display cationic properties, whereas Groups A, D, E

and G are anionic (Figure 3B). Phylogenetic reconstructions found that some ALF Groups are shared among different decapods while other Groups are taxon-specific.²⁴

The ALF family has the broadest spectrum of antimicrobial activity when compared to the other crustaceans AMPs. For instance, the shrimp *ALFPm3* (Group B) exhibits strong activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi and viruses.^{62,67,68} On the other hand, while some ALFs exhibit lower antibacterial and antifungal activities,^{24,66,69–73} other members are quite inactive in *in vitro* assays.^{24,64,71,74} Notably, even though these peptides do not exhibit significant antimicrobial activities, some members can still display binding properties.⁷⁴ These findings suggest that some ALFs may act in synergy with other AMPs or may be involved in additional biological roles, such as the promotion of wound healing and in the regeneration of tissues.²⁴

The ALF genes share a conserved structural organisation composed of three exons interrupted by two introns. The second exon encodes the four-stranded β -sheets containing the two cysteines that flank the central β -hairpin.²⁴ The gene expression of ALFs is generally modulated by distinct pathogens (*e.g.*, viruses, bacteria and filamentous fungi) and by tissue damage.^{24,64,75,76} This gene regulation seems to be controlled by both NF- κ B (Toll and IMD) and JAK/STAT pathways.^{77–80} Most ALFs are simultaneously expressed in the haemocytes of a single animal.^{24,64} As observed for other crustacean AMPs, the *ALFPm3* from *P. monodon* was shown to be exclusively produced by granular haemocytes.⁶⁵ However, some ALF members are predominantly expressed by other tissues than haemocytes, such as gills,⁸¹ lymphoid organ,⁷¹ intestines and hepatopancreas.⁸² Considering that the circulatory system of crustaceans is generally an open system with haemolymph flowing freely in the body cavity, it is still not clear if these expression patterns are related to tissue-specific cells or infiltrating haemocytes.^{4,65}

In addition to the authentic members of the ALF family, sequences displaying similar molecular signatures have been also described in crustaceans. Scygonadins are anionic ALF-related molecules originally purified from the seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata*.²³ Indeed, both scygonadins and ALFs are very similar in terms of structure and gene organisation. In terms of structure, scygonadin precursors are composed of a leader sequence followed by a mature polypeptide containing two cysteine residues flanking 17 amino acid residues. They are predominantly expressed in the ejaculatory duct of males during the mating period and in the early stages of embryogenesis.⁸³ Regarding their antimicrobial properties, *in vitro* assays have shown that both recombinant and native polypeptides display activity mainly against Gram-

positive bacteria.^{23,84,85} Phylogenetic reconstructions suggested that scygonadins diverged from an ancestor ALF-related gene only in crabs (Figure 3B). Likewise, ALF-like sequences containing three or four cysteine residues are exclusively found in penaeid shrimp,²⁴ indicating that distinct ALF-related molecules might have evolved in crustaceans (Figure 3B).

4. Taxonomically-restricted crustacean AMPs

All known AMP families were only described in crustaceans from the class Malacostraca. Except for crustins and ALFs, most crustacean AMPs are specific to a particular taxonomic group. For economic reasons, the best characterised crustacean AMP families have been identified in cultivated species from the order Decapoda. The order Decapoda is divided into two suborders: Dendrobranchiata (penaeid shrimp) and Pleocyemata (*e.g.*, crayfish, palaemonids, crabs and lobsters). From the ten taxonomically-restricted AMP families, two are specific of penaeids (penaeidins and stylicins) and seven are exclusively found in decapods from Pleocyemata (PR-AMPs, GR-AMPs, arasins, hyastatins, astacidins, panusins and paralithocins). Apart from these nine decapod-specific AMPs, only one AMP family was described in terrestrial isopods (Peracarida: Isopoda), the armadillidins (Figure 1).

4.1. Dendrobranchiata (penaeid shrimp)

The Dendrobranchiata (with two superfamilies: Penaeoidea and Sergestoidea) includes many species commonly referred to as ‘shrimp’ or ‘prawn’. Particularly, this taxon assembles the most important cultivated crustacean species, the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*, the black tiger shrimp *P. monodon*, the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*, the fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* and the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. Up to now, only two penaeid shrimp-specific gene-encoded AMPs were described: penaeidins and stylicins (Figure 1).

4.1.1. Penaeidins

Penaeidins were first discovered in the Pacific whiteleg shrimp (*L. vannamei*) by combining both biochemical and molecular approaches. Three peptides (initially named Pen-1, -2 and -3) were purified in their mature forms and tested for their range of antimicrobial activity.¹³ These three penaeidins were initially classified into three classes, but a subsequent study showed that class 1 and class 2 were actually isoforms of the same class (renamed class 1/2).⁸⁶ This same molecular study also found the existence of a fourth penaeidin class, named

class 4.⁸⁶ Since the discovery of the first penaeidin members, a series of homologue sequences have been identified in different shrimp species, and a classification system and standard nomenclature were proposed.¹⁹ This classification system was based on amino acid sequence signatures and divided penaeidins into three subgroups: PEN1/2, PEN3 and PEN4. A fourth penaeidin subgroup (PEN5) was later recognised in *F. chinensis* and *P. monodon*.^{87,88}

PEN1/2 to -5 are considered as ‘classic penaeidins’ and are produced as precursors containing a leader sequence followed by a two-domain cationic peptide (4.7-7.2 kDa).² The mature peptide is composed of an N-terminal proline/arginine-rich region followed by a C-terminal region containing six conserved cysteine residues (Figure 4A; Supplementary Figure 1). The three-dimensional structure of a recombinant PEN3 from *L. vannamei* (*Litvan* PEN3; PDB: 1UEO) and a synthetic PEN4 from *L. setiferus* (*Litset* PEN4; PDB: 1XV3) was solved by NMR spectroscopy and is composed of an unconstrained motif at the N-terminus followed by an amphipathic helix and two coils stabilised by three disulphide bonds at the C-terminus^{89,90} (Figure 4A). The mature peptides can be also posttranslationally modified by an N-terminal pyroglutamic acid and a C-terminal amide.¹³

Besides the four classical subgroups, a unique member holding an additional N-terminal serine-rich region was identified in the kuruma prawn *M. japonicus*, the *MjPen-II* (12.1 kDa)⁹¹ (Figure 4A; Supplementary Figure 1). An et al.⁹¹ then proposed a division of penaeidins into two subfamilies, subfamily I (PEN1/2 to -5) and subfamily II (*MjPen-II*), but this classification system is not universally accepted due to the lack of consistent phylogenetic resolution. Most recently, another unique penaeidin was discovered in *L. vannamei* and named BigPEN.⁹² Indeed, the *L. vannamei* BigPEN is a large member of 27.1 kDa that contains an additional repeat (RPT) region at its N-terminus (Figure 4A; Supplementary Figure 1). Unlike the other three structural regions found in penaeidins (serine-rich, proline-rich and cysteine-rich), the RPT region is not rich in any specific amino acid residue.⁹²

Interestingly, the distribution of the different penaeidin members appears to be species-specific. While PEN3 showed to be present in many species, PEN1/2 and PEN4 are restricted to Occidental species from the genera *Litopenaeus* and *Farfantepenaeus*.⁹³ On the other hand, PEN5 appears to be only present in some Oriental (Asian) species (*Fenneropenaeus*, *Metapenaeus* and *Penaeus*).⁹⁴ Finally, while *MjPen-II*-like sequences were also identified in transcriptomic datasets from *Penaeus longistylus* (GenBank: GGTU01007281) and *Penaeus latisulcatus* (GenBank: GGTT01006437), BigPEN homologues appears to be present in different penaeid groups (*Farfantepenaeus*, *Fenneropenaeus*, *Metapenaeus*, *Penaeus*).

Each penaeidin member is encoded by a separate gene and simultaneously transcribed in a single shrimp.^{86,95} The cysteine-rich region, a characteristic of penaeidins, is specifically encoded by a separate exon.^{87,95} Interestingly, this cysteine pattern is also found in hyastatins, a crab-specific AMP family (see below).⁹⁶ Penaeidins are constitutively expressed in granular haemocytes of healthy individuals and are massively released into the plasma in response to microbial challenge.¹⁵ During infections, penaeidin-expressing haemocytes migrate to sites of infection and were shown to colocalise with the bacterial pathogens.⁹⁷ In *L. vannamei*, penaeidins represent more than 10% of the transcripts expressed in haemocytes,^{13,58} being PEN3 the most expressed gene by far.⁹⁵ The regulation of the penaeidin genes seems to be controlled by both Toll and IMD NF- κ B pathways.^{80,92}

Most penaeidins from subgroups PEN1/2, PEN3 and PEN4 are active against Gram-positive bacteria and filamentous fungi,² while PEN5 is active against some Gram-negative bacteria⁸⁷ and also participates in antiviral defences against the White spot syndrome virus (WSSV).⁸⁸ Comparatively, the *MjPen-II* polypeptide showed to be active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.⁹¹ The involvement of penaeidins as antiviral effectors was also described. For instance, *L. vannamei* penaeidins showed to interact with WSSV envelope proteins preventing the viral propagation.⁹² Besides their direct antimicrobial function, these peptides also behave as cytokines attracting haemocytes towards sites of injury.⁹⁸ Furthermore, some members can bind to chitin, suggesting a role in wound healing.¹⁵

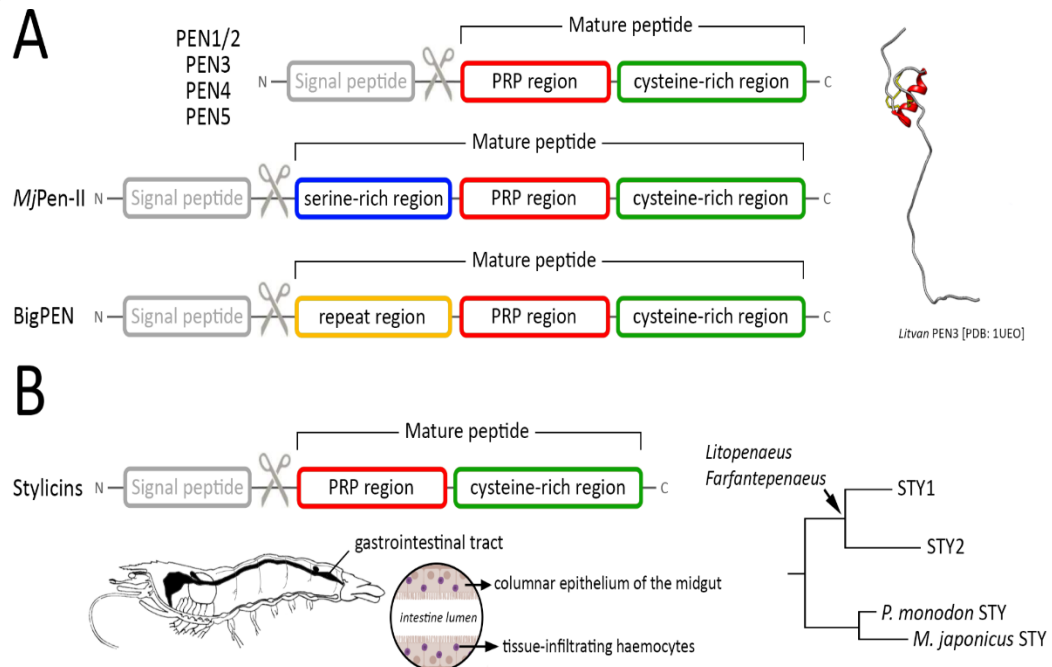
4.1.2. Stylicins

Stylicins were initially identified as transcripts associated with shrimp survival to pathogenic *Vibrio* infections.⁹⁹ These undescribed sequences were then recombinantly expressed and examined for their biological functions.¹⁰⁰ Stylicins are encoded as precursor molecules composed of a leader sequence followed by an anionic two-domain peptide (8.6-9.2 kDa) composed of an N-terminal proline/arginine-rich region and a C-terminus containing 13 conserved cysteine residues¹⁰⁰ (Figure 4B; Supplementary Figure 1). In the genera *Litopenaeus* and *Farfantepenaeus*, stylicins form a diverse AMP family composed of two members (STY1 and STY2), while in *M. japonicus* and *P. monodon* only a single member was identified^{93,101} (Figure 4B). All known stylicin genes share a similar gene organisation: two exons interrupted by a single intron.¹⁰¹

The antimicrobial activity of stylicins seems to be restricted to filamentous fungi as described for the recombinant *rLsty-Stylicin1* from the blue shrimp *L. stylirostris*.¹⁰⁰

Interestingly, the *rLsty*-Stylicin1 peptide also displayed a strong LPS-binding activity and the ability to agglutinate Gram-negative bacteria, suggesting additional roles for these anionic AMPs.¹⁰⁰ Stylicins are constitutively expressed in the haemocytes, whose expression is induced in response to both bacterial and viral infections.^{100–102} However, in animals succumbing to lethal fungal infections, the gene expression of stylicins is drastically reduced.⁷⁶ Remarkably, the stylicins from *L. vannamei* (*Lvan*-Stylicins) are also produced by the columnar epithelial cells lining the midgut (Figure 4B), suggesting that these effectors are also involved in the control of the gut microbiota and in shrimp intestinal defences.¹⁰¹

Figure 4. Taxonomically-restricted crustacean AMPs from penaeid shrimp: penaeidins and stylicins.



(A) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of the classic penaeidins (PEN1/2 to PEN-5), *MjPen*-II and *BigPEN*: the serine-rich region (blue), the repeat region (yellow), the proline/arginine-rich (PRP) region (red) and the cysteine-rich region (green). Three-dimensional structure of *Litvan* PEN3 (PDB: 1UEO) from the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. (B) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of stylicins: the PRP region (red) and the cysteine-rich region (green). Stylicins from *L. vannamei* (*Lvan*-Stylicins) are produced by both circulating and tissue-infiltrating hemocytes and by the columnar epithelial cells lining the midgut. Duplication of the stylicin gene occurred in penaeids from the genera *Litopenaeus* and *Farfantepenaeus*.

4.2. Pleocyemata (crayfish, palaemonids, crabs, lobsters)

The Pleocyemata (with ten infraorders: Achelata, Anomura, Astacidea, Axiidea, Brachyura, Caridea, Gebiidea, Glypheidea, Polychelida and Stenopodidea) is a very diverse suborder that includes nearly all nonpenaeid decapods, such as crayfish, palaemonids, anomuran and brachyuran crabs, spiny and true lobsters, etc. Seven specific gene-encoded

AMPs were identified in this decapod taxon: PR-AMPs (brachyuran crabs), GR-AMPs (brachyuran crabs), arasins (brachyuran crabs and crayfish), hyastatins (brachyuran crabs), astacidins (crayfish), panusins (spiny and true lobsters) and paralithocins (anomuran crabs) (Figure 1).

4.2.1. Crab proline-rich AMPs (PR-AMPs)

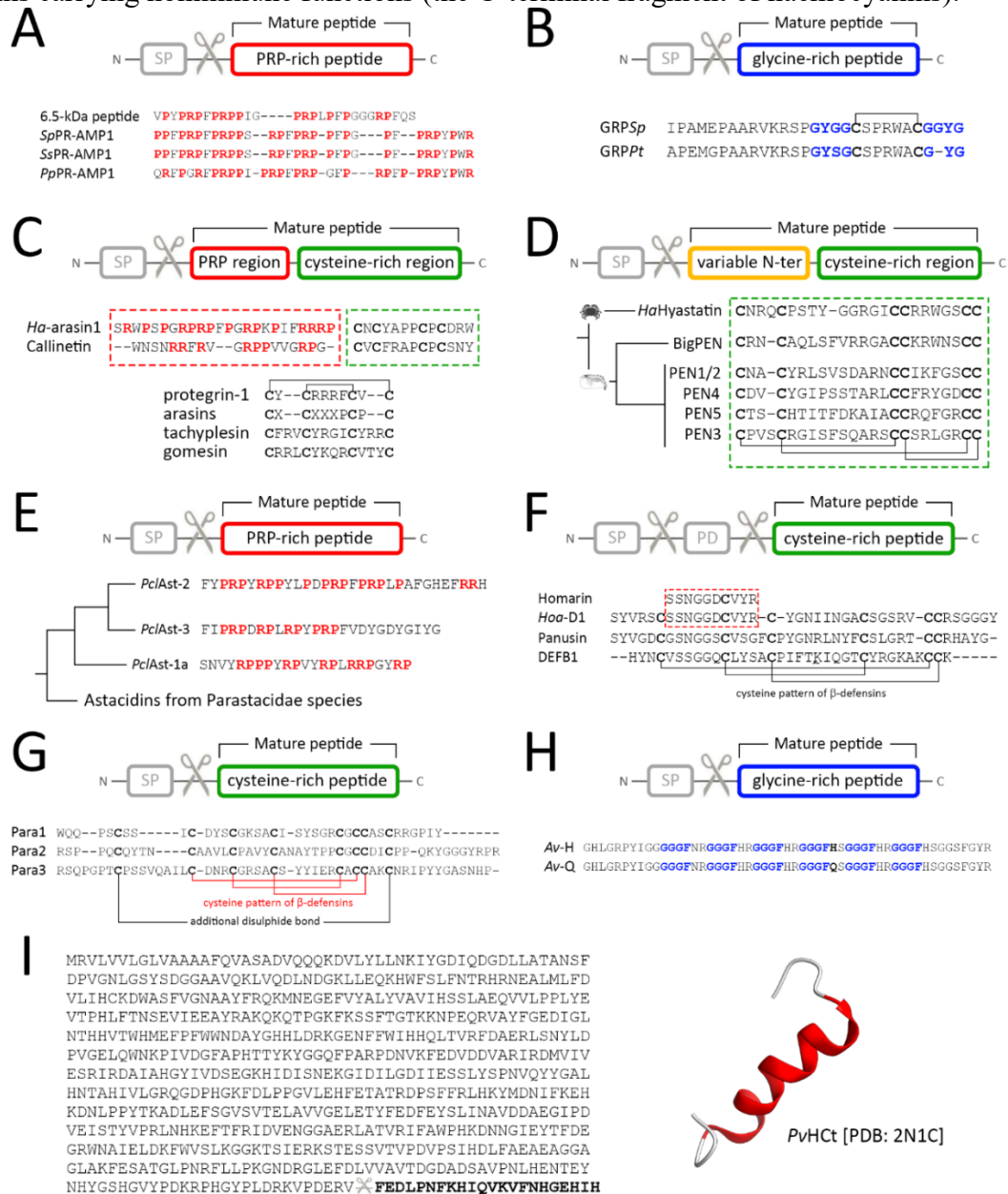
Crab proline-rich AMPs (PR-AMPs), historically the first AMPs to be isolated from crustaceans, are short linear cationic peptides found in brachyuran crabs from the superfamily Portunoidea (Carcinidae and Portunidae).¹⁰³ The first PR-AMP member was originally purified from the haemocytes of *C. maenas* and named ‘6.5-kDa bac-like peptide’ due to its sequence similarity to the bovine neutrophil antibacterial peptide, bactenecin-7.¹² PR-AMPs are produced as precursors containing a leader sequence followed by a mature peptide (4-6 kDa) containing many repeats of the Pro-Arg-Pro tripeptide (Figure 5A). This structural motif, usually known as PRP-domain, is also found in other crustacean AMP families, such as arasins, astacidins, hyastatins and penaeidins.⁷ These highly cationic AMPs ($pI \sim 12$) are active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Vibrio* species.^{12,103}

4.2.2. Crab glycine-rich AMPs (GR-AMPs)

GR-AMPs (for glycine-rich AMPs) are cationic peptides of ~3 kDa that were first identified in the mud crab *Scylla paramamosain* by screening a haemocyte expressed sequence tag (EST) library for putative glycine-rich AMPs.¹⁰⁴ The first GR-AMP member, *S. paramamosain* GRP*Sp*, displayed no similarities to other previously described AMP families. Nonetheless, GRP*Sp* homologues showed to be present in genomes of other brachyuran crabs from the family Portunidae, including the swimming crab *Portunus trituberculatus* (GenBank: VSRR010040263). Crab GR-AMPs are mainly expressed by haemocytes and are produced as precursors containing a leader sequence followed by a cationic peptide ($pI \sim 9.6$) containing a pair of cysteines likely to form a disulphide bond (Figure 5B). Like the NLP-1 AMP from the nematode *Caenorhabditis elegans*, GRP*Sp* also contains the glycine structural motifs Gly-Tyr-Gly-Gly and Gly-Gly-Tyr-Gly, that flank its two cysteine residues (Figure 5B). A chemically synthesised GRP*Sp* peptide showed bacteriostatic activities only against the Gram-positives *Aerococcus viridans* and *Micrococcus luteus*.¹⁰⁴ A similar *in silico* approach was also adopted for the identification of AMP-encoding transcripts in the red swamp crayfish *Procambarus clarkia*.²⁶ However, unlike GRP*Sp*, the spectrum of antimicrobial activity of the putative

glycine-rich peptide identified in *P. clarkii*, tentatively referred to as ‘procambarin’, has not yet been determined, and therefore it cannot be considered as an authentic crustacean AMP.

Figure 5. Taxonomically-restricted crustacean AMPs from nonpenaeid shrimp (crab proline-rich AMPs or PR-AMPs, crab glycine-rich AMPs or GR-AMPs, arasins, hyastatins, astacidins, panusins, paralithocins and armadillidins) and unconventional AMPs encrypted in large proteins carrying nonimmune functions (the C-terminal fragment of haemocyanins).



(A) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of PR-AMP precursors. The proline and arginine residues found in the proline/arginine-rich (PRP) region are highlighted in red. (B) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of GR-AMP precursors. The two glycine motifs found in the mature glycine-rich peptide are highlighted in blue. (C) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of arasins: the PRP region (red) and the cysteine-rich region (green). The four cysteine residues found in arasins are spaced in a pattern similar to protegrins, tachypleisins and gomesins. (D) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of hyastatins: the variable N-terminal region (yellow) and the cysteine-rich region (green). The six cysteine residues found in hyastatins are spaced in a pattern similar

to penaeidins. (E) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of astacidin precursors. Astacidins are divided into three main groups (Astacidin-1 to -3) and one divergent group containing astacidins from Parastacidae species. (F) Panusin precursors are composed of a leader sequence (signal peptide or SP) followed by an anionic prodomain (PD) and a mature peptide containing six cysteine residues at positions conserved in β -defensins. (G) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of paralithocin precursors. The six internal cysteine residues found in paralithocins are spaced in a pattern similar to β -defensins. (H) Schematic representation (not to scale) of the structural organisation of armadillidin precursors. The glycine motifs found in the mature peptide are highlighted in blue. (I) Primary amino acid sequence of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) haemocyanin (GenBank: AHY8647) showing the C-terminal fragment generated by its proteolysis. Threedimensional structure of PvHCt (PDB: 2N1C) from *L. vannamei*. SP = signal peptide/leader sequence.

4.2.3. Arasins

The history of arasins goes over a decade back when this AMP family was first characterised in 2008. It all started with the identification of a proline/arginine-rich peptide of 3.7 kDa from the haemocytes of the blue crab *Callinectes sapidus*.²¹ At that time, this peptide (named ‘callinectin’) was only partially characterised and its complete amino acid sequence was only reported twelve years later.²² The characterisation of the callinectin full sequence revealed that it is not a unique AMP but rather a member of the arasin family.¹⁰⁵

Arasin precursors are composed of a leader sequence and a cationic two-domain peptide (3.7-5.2 kDa) including a linear proline/arginine-rich N-terminal region followed by a C-terminal region containing four cysteine residues (Figure 5C). Interestingly, these four cysteine residues are spaced in a pattern similar to other AMPs, such as protegrins, tachyplesins and gomesins (Figure 5C). Whereas callinectin is posttranslationally modified by the oxidation of its N-terminal tryptophan residue and by a C-terminal amide,²² the mature *Ha*-arasin1 from the small spider crab *Hyas araneus* is processed by the cleavage of two residues (Arg-His) at the C-terminal end.¹⁰⁵

Arasins are found in crabs and crayfish and are constitutively synthesised and stored in granular haemocytes.^{22,106} These AMPs show a broad spectrum of activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.^{104,105,107,108} Besides its antimicrobial properties, the N-terminal proline/arginine-rich region of the *Ha*-arasin1 (the truncated peptide ‘PR-39’) displayed chitin-binding activity *in vitro*.¹⁰⁹ Moreover, it was shown that the most probable mechanism of action of this truncated peptide involves intracellular targets.¹⁰⁹

4.2.4. Hyastatins

Hyastatins are cationic disulphide-rich polypeptides (~12 kDa) produced by the granular haemocytes of brachyuran crabs. The first hyastatin member was purified from spider crabs (*H. araneus*) and exhibited antimicrobial activity against yeasts and both Gram-positive

and Gram-negative bacteria.⁹⁶ They are synthesised as precursor molecules and, after the cleavage of the leader sequence, the mature polypeptide is posttranslationally modified by a C-terminal amide.⁹⁶ Structurally, hyastatins are composed of a variable N-terminal region followed by a C-terminal region containing six conserved cysteine residues (Figure 5D). The N-terminal region of hyastatins can differ in terms of both length and amino acid composition. For instance, while the N-terminus of *H. araneus* hyastatin (*HaHyastatin*) is rich in glycine residues, the N-terminal region of hyastatins from *S. paramamosain*¹¹⁰ and *P. trituberculatus* do not possess any specific amino acid signature. Interestingly, the glycine-rich N-terminus of the hyastatin from *H. araneus* showed the ability to bind chitin.⁹⁶

Apart from the presence of a variable N-terminal region, perhaps the most intriguing structural feature of hyastatins is in their C-terminus. Noteworthy, the C-terminal cysteine pattern of hyastatins is identical to that found in penaeidins (Figure 5D) and their genomic organisation is quite similar: two exons interrupted by a single intron.^{95,110} In both cases, the second exon codes for the six conserved cysteine residues. These findings suggest a close evolutionary relationship between hyastatins and penaeidins. However, until now, it is not clear whether they are only close cousins or members of the same superfamily of decapod-specific AMPs.

4.2.5. Astacidins

Astacidins are short cationic proline/arginine-rich peptides originally isolated from the haemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*.¹¹¹ They comprise a multigene AMP family, apparently restricted to crayfish (Astacoidea and Parastacoidea), which are subdivided into three main groups (Astacidin-1 to -3) and one divergent group containing astacidins from Parastacidae species¹¹² (Figure 5E). The first member of this family, the *P. leniusculus* astacidin-2 belonging to the Astacidin-1 group, showed to be synthesised in haemocytes as a precursor molecule (Figure 5E), which after leader sequence cleavage, is processed at both ends resulting in a mature peptide amidated at the C-terminus.¹¹¹ However, unlike astacidins from groups 1 and 3, Astacidin-2 members seem to be not processed at their C-terminal region (proteolytic cleavage of the two last C-terminal residues).¹¹² Generally, astacidins possess a broad spectrum of activity, being active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.^{111–113} In addition to their antibacterial properties, astacidins have also the ability to bind to bacterial cell wall components.¹¹³

4.2.6. Panusins (β -defensin-like peptides)

Panusins are related to defensins, which are undoubtedly one of the best studied gene-encoded AMPs, being found in nearly all multicellular organisms, from fungi and plants to invertebrates and vertebrates.¹⁰ Defensins comprise a large and diverse group of disulphide-rich peptides that are classified into two superfamilies: *cis*-defensins and *trans*-defensins.¹¹⁴ While *cis*-defensins are widely distributed across fungi, plants and animals (especially in invertebrates), *trans*-defensins are exclusive of metazoans. Based on the arrangement of their six conserved cysteine residues, *trans*-defensins are subdivided into different families: α -defensins, β -defensins, θ -defensins and big defensins. While most *trans*-defensins are limited to vertebrates, big defensins are present in both protostomes and deuterostomes. Big defensins, believed to be the ancestors of *trans*-defensins, have a very scattered distribution across metazoans (horseshoe crabs, amphioxys and most lophotrochozoans) and show the same cysteine pairing pattern found in β -defensins (Cys₁₋₅Cys₂₋₄Cys₃₋₆).¹⁰ Even if β -defensins are vertebrate-specific, some β -defensin-like peptides also occur in a restricted group of decapod crustaceans.

The β -defensin-like peptides from crustaceans are known as ‘panusins’ and are found in true lobsters (Nephropidae) and spiny lobsters (Palinuridae).¹¹⁵ Panusins are short cationic peptides (~4 kDa) that were first discovered in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* by screening a haemocyte EST library.¹¹⁶ Typically, panusins precursors are composed of a leader sequence followed by an anionic prodomain and a mature cationic peptide (pI ~8.5) containing six cysteine residues at positions conserved in vertebrate β -defensins (Figure 5F). The mature peptides are then posttranslationally modified by a C-terminal amide.^{16,115} These β -defensin-like peptides are mainly produced by granule-containing haemocytes¹⁶ and are active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeast even at high salt concentrations.¹¹⁵

Interestingly, the panusin member *Hoa*-D1 from the American lobster *Homarus americanus*¹⁶ appears to be the same peptide (homarin) that was previously identified by Battison et al.²⁰ At that time, the *H. americanus* homarin peptide was only partially characterised and showed activity against ciliated protozoans and a *Vibrio* strain isolated from lobster intestinal contents.²⁰ Finally, it is important to highlight that *trans*-defensins have a very narrow taxonomic distribution (lobsters, spiny lobsters and vertebrates) and that, to date, unlike their other arthropod relatives such as insects and chelicerates, homologues of *cis*-defensins were not found in any crustacean species.⁷

4.2.7. Paralithocins

Paralithocins are the most recent AMPs to be identified in crustaceans. They are disulphide-rich peptides originally isolated from haemocyte extracts of the red king crab *Paralithodes camtschaticus*.¹¹⁷ They comprise a multigene family composed of three members (paralithocin-1, paralithocin-2 and paralithocin-3) that are produced as precursors containing a leader sequence followed by a cationic peptide (4-5 kDa) containing eight conserved cysteine residues engaged in four disulphide bridges (cysteine pairing: Cys₁₋₈Cys₂₋₆Cys₃₋₅Cys₄₋₇) (Figure 5G). Interestingly, despite the presence of an additional disulphide bond (Cys₁-Cys₈), the other six internal cysteine residues found in paralithocins show the same cysteine pairing pattern found in panusins¹¹⁵ and in both big defensins and vertebrate β -defensins¹⁰ (Figure 5G). However, no clear phylogenetic relationships appear to exist between paralithocins and those cysteine-rich AMP families. All native paralithocin members showed a weak antibacterial activity *in vitro*, being mainly active against Gram-positive marine bacteria.¹¹⁷

4.3. AMPs from nondecapod crustaceans

Due to their economic importance, most studies have been carried out in decapod crustaceans and, therefore, only very few research groups have ventured to study AMPs in other taxa. Until now, only one gene-encoded AMP family was identified and fully characterised in a nondecapod species, the armadillidins (Figure 1). Armadillidins are linear cationic peptides originally isolated from the haemocytes of the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Peracarida: Isopoda).¹¹⁸ They are produced as precursors containing a leader sequence followed by a mature peptide (4.4-5.7 kDa) rich in glycine residues that is posttranslationally modified by a C-terminal amide^{39,118} (Figure 5H). They are exclusively found in terrestrial isopods (Armadillidiidae and Porcellionidae)³⁹, and in *A. vulgare* two isoforms were identified: armadillidin H and armadillidin Q.¹¹⁹ Both isoforms are characterised by the presence of the sixfold repeated motif Gly-Gly-Gly-Phe and differ in only one amino acid residue (His or Gln at position 33) (Figure 5H). *A. vulgare* armadillidins H and Q showed a broad spectrum of activity, being active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and filamentous fungi.¹¹⁹ It was shown that armadillidin H induces cell membrane damages in prokaryotic cells and that the most probable mechanism of action involves membrane permeabilisation.¹¹⁹

Apart from the isopod-specific armadillidin AMP, a peptide referred to ‘CMCC-1’, with specific antibacterial activity against the Gram-positive *Staphylococcus aureus*, was identified in the Antarctic krill *Euphausia superba* (Eucarida: Euphausiacea).²⁵ Unfortunately,

this peptide was only partially characterised and its sequence and biochemical features were not yet determined.

5. Other antimicrobial-related molecules and unconventional AMPs

In addition to those classical gene-encoded AMPs, diverse peptides with antimicrobial activity are encrypted in proteins better known for other biological functions and sometimes being generated as a cleavage product. In this section, we briefly explore the findings of these antimicrobials in crustaceans.

In crustaceans, haemocyanins are copper-containing oxygen carrier proteins that can be processed in different bioactive peptides involved in multiple functions, including antimicrobial activity. They are produced by the hepatopancreas and constitutively released into the plasma. In shrimp, the C-terminus fraction of haemocyanin generates an anionic histidine-rich peptide folded as an amphipathic alpha-helix (Figure 5I) that displays strong activity specifically against fungi.^{120,121} These peptides accumulate at the surface of fungal hyphae disrupting plasma membrane integrity and causing fungal death.¹²¹ Remarkably, it was shown that these haemocyanin fragments are constitutively present in the haemolymph, but facing injury or immune-challenge, their quantity is significantly increased in the plasma.¹²⁰ On the other hand, in the crayfish *P. leniusculus*, the C-terminal proteolysis of haemocyanin by a cysteine-like proteinase generates a cationic peptide active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.¹²²

Lysozymes are proteins that display antimicrobial activity but generally are not considered classical AMPs due to their enzymatic activities targeting specific molecules. Two types of lysozymes, the invertebrate type (i-type or destabilase) and the chicken or conventional type (c-type), have been described in crustaceans, displaying activity against Gram-negative bacteria.^{123–125} Lysozymes kill bacteria by catalytic hydrolysis of cell wall peptidoglycan, but it also exhibits catalysis-independent antimicrobial properties.⁶ Recently, it was shown that these peptides interact with WSSV proteins and are involved in shrimp antiviral response.¹²⁶

Histones are DNA-binding proteins that form the nucleosome and are involved in the regulation of DNA transcription, replication and assembly. A series of studies have shown that histones and histone-derived fragments exhibit broad-spectrum antimicrobial activities, playing a role in the innate immune defence of different animal taxa.¹²⁷ In shrimp, it was shown that core histone proteins from the haemocytes display antimicrobial activity¹²⁸ in a process

involving the release of extracellular traps (ETs).⁶ During ET formation, DNA and AMPs form complex structures to entrap invading microbes.⁶

Peritrophins are proteins that interlock chitin fibrils to form the peritrophic membrane of invertebrates. They were first isolated from the intestine of insects, but some homologues have been identified in several invertebrates, including crustaceans. Peritrophins display important roles in the digestive system, surrounding food bolus, facilitating digestion, and protecting the gut from abrasion, toxins and infections.¹²⁹ In crustaceans, peritrophin-like proteins are also found as components of the egg layer and seem to be implicated in host defence.¹³⁰ Peritrophin-like proteins displayed *in vitro* antimicrobial activity¹³¹ and were shown to be able to bind to WSSV envelope proteins.¹³² However, additional studies are still necessary to explore the mechanism of action of these proteins and clarify their role in crustacean immunity.

Furthermore, some immune effectors related to microbial recognition and signalling pathways were described displaying antimicrobial activity in crustaceans. Lectins are a complex group of glycoproteins that act as pattern recognition receptors due to their noncatalytic highly conserved domain that recognises specific sugar moieties on the surface of microorganisms.³ Although antimicrobial activity is not the primary role of lectins, several studies have shown that lectins exert direct antimicrobial functions.¹³³ Finally, pellino is an evolutionarily conserved protein that plays a crucial role in immune response, acting as a scaffold molecule in the Toll NF- κ B pathway. Pellino-1 expression was shown to be induced in some crustacean species after microbial challenge^{134,135} and pellino-derived peptides displayed antimicrobial activity and the ability to bind DNA.¹³⁵

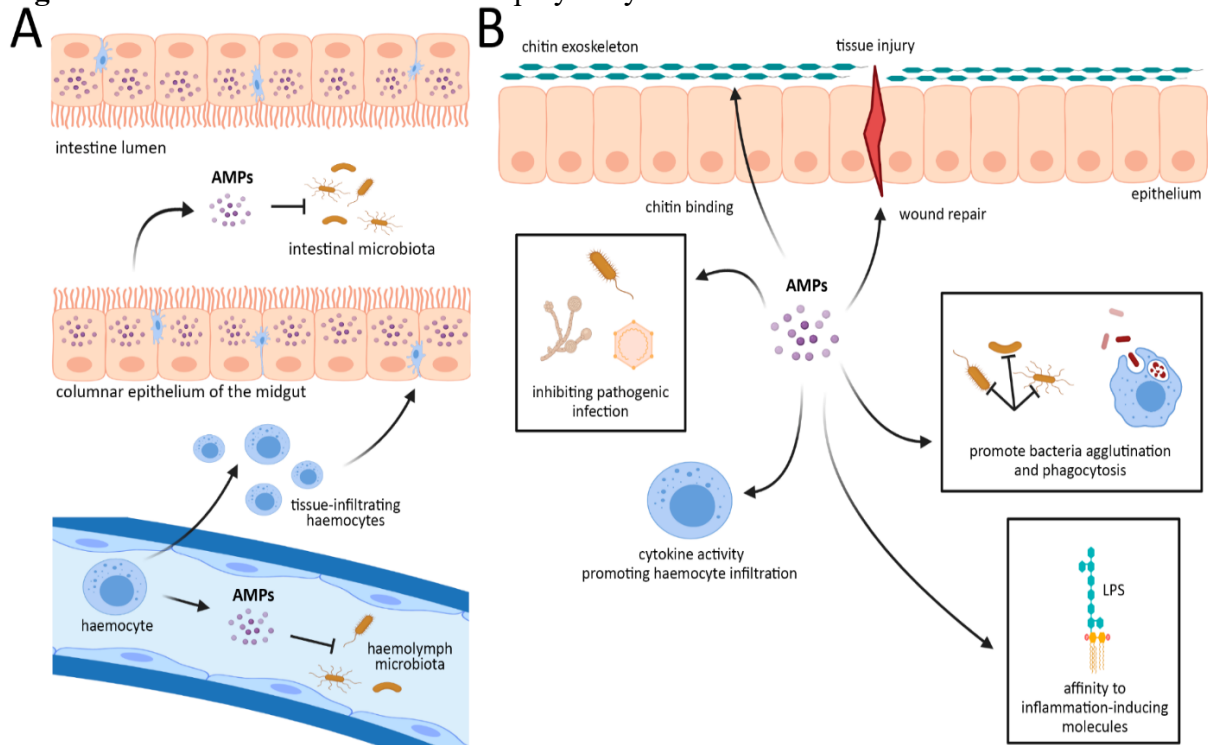
6. Essential role of AMPs in crustacean immunity and in host-microbe interactions

AMPs are diverse molecules, displaying distinct biochemical features, sites of expression, and molecular functions in addition to their widely documented antimicrobial activity. Indeed, it has been recently proposed that these molecules should be referred to as 'host defence peptides' to better define their multifaceted roles as immunomodulatory mediators.¹³⁶ In this section, we expand on the previously mentioned roles played by AMPs in crustacean immunity, which go beyond the antimicrobial function described for each family in the previous sections.

The interaction between the immune system and the diverse array of microorganisms that harbours the crustacean body surfaces (*e.g.*, haemolymph and the gastrointestinal tract) is

essential to animal health and survival.¹ Together with other immune effectors, AMPs play a major role regulating antimicrobial responses and, consequently, the balance between homeostasis and pathogenesis. These effectors seem to be expressed synergistically by infiltrated haemocytes⁴ and the epithelia^{5,101,137} (Figure 6). In the black tiger shrimp *P. monodon*, the silencing of ALF $Pm3$ (Group B ALF) by RNAi leads to an increase in bacteria in shrimp tissues resulting in shrimp death.⁷⁵ A similar response was observed in *M. japonicus*, in which the silencing of a C-type lectin, whose interaction with haemocyte receptors is responsible for the regulation of AMP expression, results in the proliferation of the haemolymph microbiota and shrimp death¹³⁸ (Figure 6). AMP expression affects not only the total amount of bacteria but also the microbiota composition as shown for a gill-abundant crustin, whose reduced expression in gills led to a change in the proportion of both potentially pathogenic and nonpathogenic bacteria.¹³⁷ Besides, it has been shown that the expression of a Type II crustin in the extremophile deepsea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* is spatiotemporally correlated with the establishment of ectosymbiotic microbial communities.¹³⁹

In addition to regulating the host microbiome, the involvement of AMPs in pathogenic infections has been widely studied in crustaceans. It has been shown that *Vibrio*-resistant animals display higher expression of AMP genes when compared to susceptible ones.^{99,140} Moreover, the silencing of ALFs and crustins results in a higher mortality rate after *Vibrio* and WSSV experimental infections^{75,80,126,141–143} (Figure 6). Likewise, taxonomically-restricted AMPs contribute to the defence against bacterial and viral infections as reported for penaeidins,^{92,99} arasins,¹⁴⁰ hyastatins^{110,140} and astacidins.¹¹³ Regarding the antiviral response, ALFs, crustins, penaeidins and lysozymes showed to be able to bind to proteins in the WSSV, inhibiting viral replication.^{51,68,92,126,144,145} Furthermore, AMPs have also been shown to participate in the defence against fungal infections.^{100,121,141}

Figure 6. Schematics of the main roles played by crustacean AMPs

(A) in the regulation of the microbiome and (B) in many immune and nonimmune functions.

Besides their direct effect on host-microbe interactions, a series of distinct roles in animal homeostasis have been reported for AMPs. In crustaceans, the expression of some AMP families including ALFs,²⁴ crustins⁴⁷ and stylicins¹⁰¹ is induced in response to tissue injuries, although little is known about the precise way AMPs promote wound healing (Figure 6). Penaeidins have shown cytokine activity promoting the migration of penaeidin-expressing haemocytes from the peripheral haemolymph towards the infection site by autocrine activity.⁹⁸ Additionally, penaeidins, hyastatins and arasins display a binding affinity to exoskeleton chitin, suggesting that they could be involved in wound healing and/or molting process.^{15,96,109} Distinct crustin members have been shown to promote phagocytosis,⁵⁴ bacteria agglutination¹⁴⁶ and haematopoiesis.¹⁴⁷ Furthermore, some AMPs (*e.g.*, ALFs, crustins and stylicins) display binding affinity to LPS, an important inflammation-inducing molecule in vertebrates (Figure 6). Indeed, shrimp ALFs can suppress the production of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated cervical cancer HeLa cells,¹⁴⁸ indicating that these AMPs could be involved in homeostasis-related processes.

7. Conclusions

Over the past 25 years since the identification of the first AMPs, the joint efforts of researchers worldwide have contributed to a better understanding of the immune system of crustaceans and of the essential role of these molecules in host-microbe interactions. In recent years, the advance in novel sequencing techniques and the generation of crustacean genomes and transcriptomes have allowed the identification of a series of novel AMP families and isoforms as well as the characterisation of molecular pathways that were previously described only in other invertebrate models. Furthermore, the application of RNAi and other gene silencing methodologies contributed to shedding light on the function of AMPs, unrevealing potential roles as immune effectors in addition to antimicrobial properties.

As bioactive molecules, crustacean AMPs are relevant due to their potential as novel therapeutic agents for the health of cultivated animals and humans. As discussed in section 6, some studies have shown the involvement of AMP families in the survival of animals against pathogenic infections. Now, with the publication of the genomes of important cultivated species,^{149,150} the discovery of additional genetic markers (*e.g.*, single-nucleotide polymorphism and copy number variation) in AMP genes has the potential to greatly contribute to the selection of disease-resistant animals. Given their wide range of bioactive properties, crustacean AMPs have also been widely explored for their potential as therapeutic agents. For instance, ALF-derived peptides are diverse bioactive molecules, modulating inflammatory responses and displaying activity against human parasites, viruses and tumours.^{148,151,152} These features emphasise the potential of crustacean AMPs as biotechnological tools and how these peptides may open the way for future drug developments.

Despite the great advance in the identification and characterisation of AMPs in crustaceans, some questions remain to be answered in future years. For instance, to date, only a few studies have described the structure and the precise mechanism of action of crustacean AMPs. Understanding the three dimensional structure of these peptides and how they interact with microorganisms is essential for their future application. Also, crustaceans display a diverse arsenal of anionic AMPs, however little is known about the way these anionic molecules interact with microorganisms and their roles as immune effectors. Finally, we still lack understanding about the presence of AMPs in taxa other than Malacostraca, since the majority of the studies have been focused on cultivated species or species of interest to aquaculture. The characterisation of AMPs in other crustacean groups would not only allow the identification of

novel AMP families and isoforms but also substantially contribute to the understanding of the evolution of AMPs in invertebrates and the discovery of novel bioactive molecules.

Acknowledgments

This article is dedicated to three inspiring and pioneering women, Evelyne Bachère, Margherita Anna Barracco and Valerie Smith (*in memoriam*), who have devoted their professional careers to the study of the immune system of marine invertebrates. We wish to thank Danielle Ferraz Mello and Priscila Gonçalves for the English corrections and proofreading of the manuscript. We also acknowledge the financial support provided by the Brazilian funding agencies CNPq (Grant numbers: 406530/2016-5 and 307032/2018-3), CAPES (PrInt 41/2017) and FAPESC (PhD scholarship to GMM).

References

1. Wang XW, Wang JX. Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. *Mol Immunol*. 2015;68(2):404-411. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.018
2. Destoumieux-Garzón D, Rosa RD, Schmitt P, et al. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2016;371(1695). doi:10.1098/rstb.2015.0300
3. Kulkarni A, Krishnan S, Anand D, et al. Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. *Rev Aquac*. 2021;13(1):431-459. doi:10.1111/raq.12482
4. Silveira AS, Matos GM, Falchetti M, 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
5. Alenton RRR, Koiwai K, Nakamura R, Thawonsuwan J, Kondo H, Hirono I. A Hint of Primitive Mucosal Immunity in Shrimp through *Marsupenaeus japonicus* Gill C-Type Lectin. *J Immunol*. 2019;203(8):2310-2318. doi:10.4049/jimmunol.1900156
6. Smith VJ, Dyrynda EA. Antimicrobial proteins: From old proteins, new tricks. *Mol Immunol*. 2015;68(2):383-398. doi:10.1016/j.molimm.2015.08.009
7. Rosa RD, Barracco MA. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebr Surviv J*. 2010;7:262-284.
8. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science (80-)*. 2020;368(6490). doi:10.1126/science.aau5480
9. Rončević TR, Puizina J, Tossi A. Molecular Sciences Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? 2019. doi:10.3390/ijms20225713
10. Gerdol M, Schmitt P, Venier P, Rocha G, Rosa RD, Destoumieux-Garzón D. Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins. *Front Immunol*. 2020;11:758. doi:10.3389/fimmu.2020.00758
11. Fan L, Sun J, Zhou M, et al. DRAMP: A comprehensive data repository of antimicrobial peptides. *Sci Rep*. 2016;6(1):1-7. doi:10.1038/srep24482
12. Schnapp D, Kemp GD, Smith VJ. Purification and Characterization of a Proline-Rich Antibacterial Peptide, with Sequence Similarity to Bactenecin-7, from the Haemocytes of the Shore Crab, *Carcinus Maenas*. *Eur J Biochem*. 1996;240(3):532-539. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0532h.x
13. Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Van Dorsselaer A, Rodriguez J, Bachère E. Penaeidins, a new

- family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem.* 1997;272(45):28398-28406. doi:10.1074/jbc.272.45.28398
14. Hanson MA, Lemaitre B. New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Curr Opin Immunol.* 2020;62:22-30. doi:10.1016/j.coi.2019.11.008
 15. Destoumieux D, Munoz M, Bulet P, Bachère E. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(8-9):1260-1271. doi:10.1007/PL00000764
 16. Vu GH, Do D, Rivera CD, Dickinson PS, Christie AE, Stemmler EA. Characterization of the mature form of a β -defensin-like peptide, Hoa-D1, in the lobster *Homarus americanus*. *Mol Immunol.* 2018;101:329-343. doi:10.1016/j.molimm.2018.07.004
 17. Bandeira PT, Vernal J, Matos GM, 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 Shellfish Immunol.* 2020;97:294-299. doi:10.1016/j.fsi.2019.12.055
 18. Bachere E. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture.* 2000;191(1-3):3-11. doi:10.1016/S0044-8486(00)00413-0
 19. Gueguen Y, Garnier J, Robert L, et al. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. *Dev Comp Immunol.* 2006;30(3):283-288. doi:10.1016/j.dci.2005.04.003
 20. Battison AL, Summerfield R, Patrzykat A. Isolation and characterisation of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2008;25(1-2):181-187. doi:10.1016/j.fsi.2008.04.005
 21. Khoo L, Robinette DW, Noga EJ. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. *Mar Biotechnol.* 1999;1(1):44-51. doi:10.1007/PL00011750
 22. Noga EJ, Stone KL, Wood A, Gordon WL, Robinette D. Primary structure and cellular localization of callinectin, an antimicrobial peptide from the blue crab. *Dev Comp Immunol.* 2011;35(4):409-415. doi:10.1016/j.dci.2010.11.015
 23. Huang WS, Wang KJ, Yang M, Cai JJ, Li SJ, Wang GZ. Purification and part characterization of a novel antibacterial protein Scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata* (Forskål, 1775). *J Exp Mar Bio Ecol.* 2006;339(1):37-42. doi:10.1016/j.jembe.2006.06.029
 24. Matos GM, Schmitt P, Barreto C, et al. Massive gene expansion and sequence diversification is associated with diverse tissue distribution, regulation and antimicrobial properties of anti-lipoplysaccharide factors in shrimp. *Mar Drugs.* 2018;16(10). doi:10.3390/md16100381
 25. Zhao L, Yin B, Liu Q, Cao R. Purification of antimicrobial peptide from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and its function mechanism. *J Ocean Univ China.* 2013;12(3):484-490. doi:10.1007/s11802-013-2180-2
 26. Zeng Y. Procambarin: A glycine-rich peptide found in the haemocytes of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and its response to white spot syndrome virus challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 2013;35(2):407-412. doi:10.1016/j.fsi.2013.04.048
 27. Zhang Z, Zhu S. Comparative genomics analysis of five families of antimicrobial peptide-like genes in seven ant species. *Dev Comp Immunol.* 2012;38(2):262-274. doi:10.1016/j.dci.2012.05.003
 28. Tanaka S, Nakamura T, Morita T, Iwanaga S. Limulus anti-LPS factor: An anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of Limulus coagulation system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;105(2):717-723. doi:10.1016/0006-291X(82)91493-0
 29. Morita T, Ohtsubo S, Nakamura T, et al. Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). *J Biochem.* 1985;97(6):1611-1620. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135218
 30. McTaggart SJ, Conlon C, Colbourne JK, Blaxter ML, Little TJ. The components of the *Daphnia pulex* immune system as revealed by complete genome sequencing. *BMC Genomics.* 2009;10. doi:10.1186/1471-2164-10-175
 31. Relf JM, Chisholm JRS, Kemp GD, Smith VJ. Purification and characterization of a cysteine-

- rich- 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem*. 1999;264(2):350-357. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00607.x
32. Smith VJ, Chisholm JRS. Antimicrobial proteins in crustaceans. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 484. Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2001:95-112. doi:10.1007/978-1-4615-1291-2_10
 33. Bartlett TC, Cuthbertson BJ, Shepard EF, Chapman RW, Gross PS, Warr GW. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. In: *Marine Biotechnology*. Vol 4. Springer; 2002:278-293. doi:10.1007/s10126-002-0020-2
 34. Smith VJ, Fernandes JMO, Kemp GD, Hauton C. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev Comp Immunol*. 2008;32(7):758-772. doi:10.1016/j.dci.2007.12.002
 35. Arayamethakorn S, Supungul P, Tassanakajon A, Krusong K. Characterization of molecular properties and regulatory pathways of CrustinPm1 and CrustinPm7 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*. 2017;67:18-29. doi:10.1016/j.dci.2016.10.015
 36. Ranganathan S, Simpson KJ, Shaw DC, Nicholas KR. The whey acidic protein family: A new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. *J Mol Graph Model*. 1999;17(2):106-113. doi:10.1016/S1093-3263(99)00023-6
 37. Tassanakajon A, Somboonwiwat K, Amparyup P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Dev Comp Immunol*. 2015;48(2):324-341. doi:10.1016/j.dci.2014.05.020
 38. Donpuksa S, Visetnan S, Supungul P, Tang S, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Type I and type II crustins from *Penaeus monodon*, genetic variation and antimicrobial activity of the most abundant crustinPm4. *Dev Comp Immunol*. 2014;47(1):95-103. doi:10.1016/j.dci.2014.06.015
 39. Becking T, Delaunay C, Cordaux R, Berjeaud JM, Braquart-Varnier C, Verdon J. Shedding light on the antimicrobial peptide arsenal of terrestrial isopods: Focus on armadillidins, a new crustacean AMP family. *Genes (Basel)*. 2020;11(1). doi:10.3390/genes11010093
 40. Barreto C, Da Rosa Coelho J, 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(1). doi:10.3390/md16010031
 41. Amparyup P, Kondo H, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol Immunol*. 2008;45(4):1085-1093. doi:10.1016/j.molimm.2007.07.031
 42. Zhao XF, Wang JX. The antimicrobial peptides of the immune response of shrimp. *Invertebr Surviv J*. 2008;5(2):162-179.
 43. Vargas-Albores F, Martínez-Porchas M. Crustins are distinctive members of the WAP-containing protein superfamily: An improved classification approach. *Dev Comp Immunol*. 2017;76:9-17. doi:10.1016/j.dci.2017.05.012
 44. Sperstad S V., Haug T, Paulsen V, et al. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Dev Comp Immunol*. 2009;33(4):583-591. doi:10.1016/J.DCI.2008.10.010
 45. Liu N, Zhang RR, Fan ZX, Zhao XF, Wang XW, Wang JX. Characterization of a type-I crustin with broad-spectrum antimicrobial activity from red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Dev Comp Immunol*. 2016;61:145-153. doi:10.1016/j.dci.2016.03.025
 46. Yu AQ, Shi YH, Wang Q. Characterisation of a novel Type I crustin involved in antibacterial and antifungal responses in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Fish Shellfish Immunol*. 2016;48:30-38. doi:10.1016/j.fsi.2015.11.019
 47. Suleiman S, Smith VJ, Dyrynda EA. Unusual tissue distribution of carcinin, an antibacterial crustin, in the crab, *Carcinus maenas*, reveals its multi-functionality. *Dev Comp Immunol*. 2017;76:274-284. doi:10.1016/j.dci.2017.06.010

48. Supungul P, Tang S, Maneeruttanarungroj C, et al. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.* 2008;32(1):61-70. doi:10.1016/j.dci.2007.04.004
49. Havanapan P orn, Taengchaiyaphum S, Ketterman AJ, Krittanai C. Yellow head virus infection in black tiger shrimp reveals specific interaction with granule-containing hemocytes and crustinPm1 as a responsive protein. *Dev Comp Immunol.* 2016;54(1):126-136. doi:10.1016/j.dci.2015.09.005
50. Tandel GM, Kondo H, Hirono I. Gills specific type 2 crustin isoforms: Its molecular cloning and characterization from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Dev Comp Immunol.* 2018;85:25-30. doi:10.1016/j.dci.2018.03.018
51. Du Z qiang, Wang Y, Ma H yu, et al. A new crustin homologue (SpCrus6) involved in the antimicrobial and antiviral innate immunity in mud crab, *Scylla paramamosain*. *Fish Shellfish Immunol.* 2019;84:733-743. doi:10.1016/j.fsi.2018.10.072
52. Dai X, Huang X, Zhang Z, et al. Molecular cloning and expression analysis of two type II crustin genes in the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Fish Shellfish Immunol.* 2020;98:446-456. doi:10.1016/j.fsi.2020.01.001
53. Jiang HS, Jia WM, Zhao XF, Wang JX. Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015;43(2):387-395. doi:10.1016/j.fsi.2015.01.001
54. Liu N, Lan JF, Sun JJ, Jia WM, Zhao XF, Wang JX. A novel crustin from *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev Comp Immunol.* 2015;49(2):313-322. doi:10.1016/j.dci.2014.11.021
55. Wang PH, Gu ZH, Wan DH, et al. The shrimp IKK-NF- κ B signaling pathway regulates antimicrobial peptide expression and may be subverted by white spot syndrome virus to facilitate viral gene expression. *Cell Mol Immunol.* 2013;10(5):423-436. doi:10.1038/cmi.2013.30
56. Huang X, Wang W, Ren Q. Dorsal transcription factor is involved in regulating expression of crustin genes during white spot syndrome virus infection. *Dev Comp Immunol.* 2016;63:18-26. doi:10.1016/j.dci.2016.05.006
57. 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;58:103-107. doi:10.1016/j.fsi.2016.09.024
58. Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW. 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*. *Dev Comp Immunol.* 2001;25(7):565-577. doi:10.1016/S0145-305X(01)00018-0
59. Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, et al. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar Biotechnol.* 2002;4(5):487-494. doi:10.1007/s10126-002-0043-8
60. Hoess A, Watson S, Siber GR, Liddington R. Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution. *EMBO J.* 1993;12(9):3351-3356. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb06008.x
61. Yang Y, Boze H, Chemardin P, et al. NMR structure of rALF-Pm3, an anti-lipopolysaccharide factor from shrimp: Model of the possible lipid A-binding site. *Biopolymers.* 2009;91(3):207-220. doi:10.1002/bip.21119
62. Somboonwiwat K, Marcos M, Tassanakajon A, et al. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.* 2005;29(10):841-851. doi:10.1016/j.dci.2005.02.004
63. Ren JD, Gu JS, Gao HF, Xia PY, Xiao GX. A synthetic cyclic peptide derived from *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor neutralizes endotoxin in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(6):775-781. doi:10.1016/j.intimp.2008.01.015
64. Rosa RD, Vergnes A, de Lorgeril J, et al. Functional Divergence in Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors (ALFs): From Recognition of Cell Wall Components to Antimicrobial Activity. *PLoS One.* 2013;8(7). doi:10.1371/journal.pone.0067937

65. Somboonwiwat K, Bachère E, Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. *Dev Comp Immunol*. 2008;32(10):1170-1176. doi:10.1016/j.dci.2008.03.008
66. Sun C, Xu WT, Zhang HW, et al. An anti-lipopolysaccharide factor from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, exhibited antimicrobial activities in vitro and in vivo. *Fish Shellfish Immunol*. 2011;30(1):295-303. doi:10.1016/j.fsi.2010.10.022
67. Tharntada S, Ponprateep S, Somboonwiwat K, et al. Role of anti-lipopolysaccharide factor from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection from white spot syndrome virus infection. *J Gen Virol*. 2009;90(6):1491-1498. doi:10.1099/vir.0.009621-0
68. Methatham T, Boonchuen P, Jaree P, Tassanakajon A, Somboonwiwat K. Antiviral action of the antimicrobial peptide ALFPm3 from *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Dev Comp Immunol*. 2017;69:23-32. doi:10.1016/j.dci.2016.11.023
69. Zhang Y, Wang L, Wang L, et al. The second anti-lipopolysaccharide factor (EsALF-2) with antimicrobial activity from *Eriocheir sinensis*. *Dev Comp Immunol*. 2010;34(9):945-952. doi:10.1016/j.dci.2010.04.002
70. Liu Y, Cui Z, Li X, Song C, Shi G, Wang C. Molecular cloning, genomic structure and antimicrobial activity of PtALF7, a unique isoform of anti-lipopolysaccharide factor from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;34(2):652-659. doi:10.1016/j.fsi.2012.12.002
71. Li S, Guo S, Li F, Xiang J. Characterization and function analysis of an anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Dev Comp Immunol*. 2014;46(2):349-355. doi:10.1016/j.dci.2014.05.013
72. Liu CC, Chung CP, Lin CY, Sung HH. Function of an anti-lipopolysaccharide factor (ALF) isoform isolated from the hemocytes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in protecting against bacterial infection. *J Invertebr Pathol*. 2014;116(1):1-7. doi:10.1016/j.jip.2013.12.001
73. Zhu L, Lan JF, Huang YQ, et al. SpALF4: A newly identified anti-lipopolysaccharide factor from the mud crab *Scylla paramamosain* with broad spectrum antimicrobial activity. *Fish Shellfish Immunol*. 2014;36(1):172-180. doi:10.1016/j.fsi.2013.10.023
74. Hou ZG, Wang Y, Hui K, et al. A novel anti-lipopolysaccharide factor SpALF6 in mud crab *Scylla paramamosain* exhibiting different antimicrobial activity from its single amino acid mutant. *Dev Comp Immunol*. 2017;72:44-56. doi:10.1016/j.dci.2017.02.009
75. Ponprateep S, Tharntada S, Somboonwiwat K, Tassanakajon A. Gene silencing reveals a crucial role for anti-lipopolysaccharide factors from *Penaeus monodon* in the protection against microbial infections. *Fish Shellfish Immunol*. 2012;32(1):26-34. doi:10.1016/j.fsi.2011.10.010
76. 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(2):294-301. doi:10.1016/j.dci.2013.09.017
77. Kamsaeng P, Tassanakajon A, Somboonwiwat K. Regulation of antilipopolysaccharide factors, ALFPm3 and ALFPm6, in *Penaeus monodon*. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-13. doi:10.1038/s41598-017-12137-5
78. Sun JJ, Xu S, He ZH, Shi XZ, Zhao XF, Wang JX. Activation of Toll pathway is different between kuruma shrimp and *Drosophila*. *Front Immunol*. 2017;8(SEP):20. doi:10.3389/fimmu.2017.01151
79. Niu GJ, Xu JD, Yuan WJ, et al. Protein inhibitor of activated STAT (PIAS) negatively regulates the JAK/STAT pathway by inhibiting STAT phosphorylation and translocation. *Front Immunol*. 2018;9(OCT). doi:10.3389/fimmu.2018.02392
80. Li C, Wang S, He J. The Two NF- κ B Pathways Regulating Bacterial and WSSV Infection of Shrimp. *Front Immunol*. 2019;10:1785. doi:10.3389/fimmu.2019.01785
81. Liu Y, Cui Z, Li X, Song C, Shi G. A newly identified anti-lipopolysaccharide factor from the swimming crab *Portunus trituberculatus* with broad spectrum antimicrobial activity. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;34(2):463-470. doi:10.1016/j.fsi.2012.11.050

82. Zhu JJ, Ye ZZ, Li CS, et al. Identification and molecular characterization of a novel anti-lipoplysaccharide factor (ALF) from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Int J Biol Macromol*. 2019;132:43-50. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.167
83. Xu WF, Qiao K, Huang SP, et al. The expression pattern of scygonadin during the ontogenesis of *Scylla paramamosain* predicting its potential role in reproductive immunity. *Dev Comp Immunol*. 2011;35(10):1078-1090. doi:10.1016/j.dci.2011.03.028
84. Yedery RD, Reddy KVR. Purification and characterization of antibacterial proteins from granular hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(1):71-82. doi:10.18388/abp.2009_2518
85. Qiao K, Xu WF, Chen HY, et al. A new antimicrobial peptide SCY2 identified in *Scylla Paramamosain* exerting a potential role of reproductive immunity. *Fish Shellfish Immunol*. 2016;51:251-262. doi:10.1016/j.fsi.2016.02.022
86. Cuthbertson BJ, Shepard EF, Chapman RW, Gross PS. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics*. 2002;54(6):442-445. doi:10.1007/s00251-002-0487-z
87. Kang CJ, Xue JF, Liu N, Zhao XF, Wang JX. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol*. 2007;44(7):1535-1543. doi:10.1016/j.molimm.2006.08.025
88. Woramongkolchai N, Supungul P, Tassanakajon A. The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infection. *Dev Comp Immunol*. 2011;35(5):530-536. doi:10.1016/j.dci.2010.12.016
89. Yang Y, Poncet J, Garnier J, Zatylny C, Bachère E, Aumelas A. Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36859-36867. doi:10.1074/jbc.M305450200
90. Cuthbertson BJ, Yang Y, Bachère E, Büllsbach EE, Gross PS, Aumelas A. Solution structure of synthetic penaeidin-4 with structural and functional comparisons with penaeidin-3. *J Biol Chem*. 2005;280(16):16009-16018. doi:10.1074/jbc.M412420200
91. An MY, Gao J, Zhao XF, Wang JX. A new subfamily of penaeidin with an additional serine-rich region from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) contributes to antimicrobial and phagocytic activities. *Dev Comp Immunol*. 2016;59:186-198. doi:10.1016/j.dci.2016.02.001
92. Xiao B, Fu Q, Niu S, Zhu P, He J, Li C. Penaeidins restrict white spot syndrome virus infection by antagonizing the envelope proteins to block viral entry. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):390-412. doi:10.1080/22221751.2020.1729068
93. Gustavo Vasconcelos Machado L, Goncalves P, Barreto C, Maria Perazzolo L, Diego Rosa R. Farfantepenaeus gene-encoded antimicrobial peptides: identification, molecular characterization and gene expression in response to fungal infections. *J Invertebr Pathol*. April 2021:107586. doi:10.1016/j.jip.2021.107586
94. Tassanakajon A, Amparyup P, Somboonwiwat K, Supungul P. Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp. *Mar Biotechnol*. 2011;13(4):639-657. doi:10.1007/s10126-011-9381-8
95. O'Leary NA, Gross PS. Genomic structure and transcriptional regulation of the penaeidin gene family from *Litopenaeus vannamei*. *Gene*. 2006;371(1):75-83. doi:10.1016/j.gene.2005.11.028
96. Sperstad S V., Haug T, Vasskog T, Stensvåg K. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Mol Immunol*. 2009;46(13):2604-2612. doi:10.1016/j.molimm.2009.05.002
97. Muñoz M, Vandenbulcke F, Garnier J, et al. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(7-8):961-972. doi:10.1007/s00018-003-3441-9
98. Li CY, Song YL. Proline-rich domain of penaeidin molecule exhibits autocrine feature by attracting penaeidin-positive granulocytes toward the wound-induced inflammatory site. *Fish Shellfish Immunol*. 2010;29(6):1044-1052. doi:10.1016/j.fsi.2010.08.020
99. de Lorgeteril J, Gueguen Y, Goarant C, et al. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Mol Immunol*. 2008;45(12):3438-3445. doi:10.1016/j.molimm.2008.04.002

100. 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(6):1269-1277. doi:10.1016/j.molimm.2009.12.007
101. Farias ND, Falchetti M, Matos GM, et al. *Litopenaeus vannamei* stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. *Fish Shellfish Immunol*. 2019;86:82-92. doi:10.1016/j.fsi.2018.11.021
102. Liu HT, Wang J, Mao Y, et al. Identification and expression analysis of a novel stylicin antimicrobial peptide from Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Fish Shellfish Immunol*. 2015;47(2):817-823. doi:10.1016/j.fsi.2015.09.044
103. Imjongjirak C, Ampaiphan P, Charoensapsri W, Amparyup P. Characterization and antimicrobial evaluation of SpPR-AMP1, a proline-rich antimicrobial peptide from the mud crab *Scylla paramamosain*. *Dev Comp Immunol*. 2017;74:209-216. doi:10.1016/j.dci.2017.05.003
104. Imjongjirak C, Amparyup P, Tassanakajon A. Two novel antimicrobial peptides, arasin-likeSp and GRPSp, from the mud crab *Scylla paramamosain*, exhibit the activity against some crustacean pathogenic bacteria. *Fish Shellfish Immunol*. 2011;30(2):706-712. doi:10.1016/j.fsi.2010.12.031
105. Stensvåg K, Haug T, Sperstad S V., Rekdal Ø, Indrevoll B, Styrvold OB. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Dev Comp Immunol*. 2008;32(3):275-285. doi:10.1016/j.dci.2007.06.002
106. Sperstad S V., Smith VJ, Stensvåg K. Expression of antimicrobial peptides from *Hyas araneus* haemocytes following bacterial challenge in vitro. *Dev Comp Immunol*. 2010;34(6):618-624. doi:10.1016/j.dci.2010.01.005
107. Chai LQ, Li WW, Wang XW. Identification and characterization of two arasin-like peptides in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol*. 2017;70:673-681. doi:10.1016/j.fsi.2017.09.059
108. Anju A, Smitha CK, Preetha K, Boobal R, Rosamma P. Molecular characterization, recombinant expression and bioactivity profile of an antimicrobial peptide, Ss-arasin from the Indian mud crab, *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunol*. 2019;88:352-358. doi:10.1016/j.fsi.2019.03.007
109. Paulsen VS, Blencke H-M, Benincasa M, et al. Structure-Activity Relationships of the Antimicrobial Peptide Arasin 1 — And Mode of Action Studies of the N-Terminal, Proline-Rich Region. Khan RH, ed. *PLoS One*. 2013;8(1):e53326. doi:10.1371/journal.pone.0053326
110. Shan Z, Zhu K, Peng H, et al. The new antimicrobial peptide sphyastatin from the mud crab *Scylla paramamosain* with multiple antimicrobial mechanisms and high effect on bacterial infection. *Front Microbiol*. 2016;7(JUL):1140. doi:10.3389/fmicb.2016.01140
111. Jiravanichpaisal P, Lee SY, Kim YA, Andrén T, Söderhäll I. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. *Dev Comp Immunol*. 2007;31(5):441-455. doi:10.1016/j.dci.2006.08.002
112. Rončević T, Čikeš-Čulić V, Maravić A, et al. Identification and functional characterization of the astacidin family of proline-rich host defence peptides (PcAst) from the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard 1852). *Dev Comp Immunol*. 2020;105:103574. doi:10.1016/j.dci.2019.103574
113. Shi XZ, Zhao XF, Wang JX. A new type antimicrobial peptide astacidin functions in antibacterial immune response in red swamp crayfish *procambarus clarkii*. *Dev Comp Immunol*. 2014;43(1):121-128. doi:10.1016/j.dci.2013.11.003
114. Shafee TMA, Lay FT, Phan TK, Anderson MA, Hulett MD. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(4):663-682. doi:10.1007/s00018-016-2344-5
115. Montero-Alejo V, Corzo G, Porro-Suardíaz J, et al. Panusin represents a new family of β -defensin-like peptides in invertebrates. *Dev Comp Immunol*. 2017;67:310-321. doi:10.1016/j.dci.2016.09.002
116. Pisuttharachai D, Yasuike M, Aono H, et al. Characterization of two isoforms of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* defensin cDNA. *Dev Comp Immunol*. 2009;33(4):434-438. doi:10.1016/j.dci.2008.11.007

117. Moe MK, Haug T, Sydnnes MO, et al. Paralithocins, Antimicrobial Peptides with Unusual Disulfide Connectivity from the Red King Crab, *Paralithodes camtschaticus*. *J Nat Prod*. 2018;81(1):140-150. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00780
118. Herbinière J, Braquart-Varnier C, Grève P, et al. Armadillidin: A novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Dev Comp Immunol*. 2005;29(6):489-499. doi:10.1016/j.dci.2004.11.001
119. Verdon J, Coutos-Thevenot P, Rodier MH, et al. Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. *Front Microbiol*. 2016;7(SEP). doi:10.3389/fmicb.2016.01484
120. Destoumieux-Garzón D, Saulnier D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachère E. Crustacean immunity: Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem*. 2001;276(50):47070-47077. doi:10.1074/jbc.M103817200
121. Petit VW, Rolland JL, Blond A, et al. A hemocyanin-derived antimicrobial peptide from the penaeid shrimp adopts an alpha-helical structure that specifically permeabilizes fungal membranes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2016;1860(3):557-568. doi:10.1016/j.bbagen.2015.12.010
122. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(4):342-348. doi:10.1016/S1473-3099(13)70002-1
123. Supungul P, Rimphanitchayakit V, Aoki T, Hirono I, Tassanakajon A. Molecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol*. 2010;28(3):490-498. doi:10.1016/j.fsi.2010.01.003
124. Kaizu A, Fagutao FF, Kondo H, Aoki T, Hirono I. Functional analysis of C-type lysozyme in penaeid shrimp. *J Biol Chem*. 2011;286(52):44344-44349. doi:10.1074/jbc.M111.292672
125. Peregrino-Uriarte AB, Muhlia-Almazan AT, Arvizu-Flores AA, et al. Shrimp invertebrate lysozyme i-lyz: Gene structure, molecular model and response of c and i lysozymes to lipopolysaccharide (LPS). *Fish Shellfish Immunol*. 2012;32(1):230-236. doi:10.1016/j.fsi.2011.10.026
126. Li H, Yin B, Wang S, et al. RNAi screening identifies a new Toll from shrimp *Litopenaeus vannamei* that restricts WSSV infection through activating Dorsal to induce antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*. 2018;14(9):e1007109. doi:10.1371/journal.ppat.1007109
127. Hoeksema M, Van Eijk M, Haagsman HP, Hartshorn KL. Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. *Future Microbiol*. 2016;11(3):441-453. doi:10.2217/fmb.15.151
128. Patat SA, Carnegie RB, Kingsbury C, Gross PS, Chapman R, Schey KL. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *Eur J Biochem*. 2004;271(23-24):4825-4833. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04448.x
129. Rodríguez-de la Noval C, Rodríguez-Cabrera L, Izquierdo L, et al. Functional expression of a peritrophin A-like SfPER protein is required for larval development in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Sci Rep*. 2019;9(1):1-14. doi:10.1038/s41598-019-38734-0
130. Loongyai W, Avarre JC, Cerutti M, Lubzens E, Chotigeat W. Isolation and functional characterization of a new shrimp ovarian peritrophin with antimicrobial activity from *Fenneropenaeus merguensis*. *Mar Biotechnol*. 2007;9(5):624-637. doi:10.1007/s10126-007-9019-z
131. Anuchan S, Deachamag P, Siammai N, Phongpaichit S, Chotigeat W. Antimicrobial Activity of Engineered Shrimp Ovarian Peritrophin Fragments from *Fenneropenaeus merguensis*. *Protein Pept Lett*. 2014;22(1):73-80. doi:10.2174/0929866521666140827114613
132. Xie S, Zhang X, Zhang J, Li F, Xiang J. Envelope proteins of White Spot Syndrome Virus (WSSV) interact with *litopenaeus vannamei* peritrophin-like protein (LvPT). *PLoS One*. 2015;10(12). doi:10.1371/journal.pone.0144922

133. Sánchez-Salgado JL, Pereyra MA, Agundis C, et al. Participation of lectins in crustacean immune system. *Aquac Res*. 2017;48(8):4001-4011. doi:10.1111/are.13394
134. Li C, Chai J, Li H, et al. Pellino protein from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* positively regulates NF- κ B activation. *Dev Comp Immunol*. 2014;44(2):341-350. doi:10.1016/j.dci.2014.01.012
135. Ravichandran G, Kumaresan V, Arasu MV, et al. Pellino-1 derived cationic antimicrobial prawn peptide: Bactericidal activity, toxicity and mode of action. *Mol Immunol*. 2016;78:171-182. doi:10.1016/j.molimm.2016.09.015
136. Hancock REW, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(5):321-334. doi:10.1038/nri.2016.29
137. Lv X, Li S, Yu Y, Zhang X, Li F. Characterization of a gill-abundant crustin with microbiota modulating function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 2020;105:393-404. doi:10.1016/j.fsi.2020.07.014
138. 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(17):11779-11790. doi:10.1074/jbc.M114.552307
139. Le Bloa S, Boidin-Wichlacz C, Cueff-Gauchard V, et al. Antimicrobial Peptides and Ectosymbiotic Relationships: Involvement of a Novel Type IIa Crustin in the Life Cycle of a Deep-Sea Vent Shrimp. *Front Immunol*. 2020;11:1511. doi:10.3389/fimmu.2020.01511
140. Zhang X, Zeng X, Sun Y, Wang Y, Zhang Z. Enhanced Immune Protection of Mud Crab *Scylla paramamosain* in Response to the Secondary Challenge by *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Immunol*. 2020;11:565958. doi:10.3389/fimmu.2020.565958
141. de la Vega E, O'Leary NA, Shockey JE, et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. *Mol Immunol*. 2008;45(7):1916-1925. doi:10.1016/j.molimm.2007.10.039
142. Shockey JE, O'Leary NA, de la Vega E, Browdy CL, Baatz JE, Gross PS. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach. *Dev Comp Immunol*. 2009;33(5):668-673. doi:10.1016/j.dci.2008.11.010
143. Hipolito SG, Shitara A, Kondo H, Hirono I. Role of *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide against *Vibrio penaeicida* and white spot syndrome virus infection. *Dev Comp Immunol*. 2014;46(2):461-469. doi:10.1016/j.dci.2014.06.001
144. Liu H, Jiravanichpaisal P, Söderhäll I, Cerenius L, Söderhäll K. Antilipopolysaccharide Factor Interferes with White Spot Syndrome Virus Replication In Vitro and In Vivo in the Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Virol*. 2006;80(21):10365-10371. doi:10.1128/jvi.01101-06
145. Suraprasit S, Methatham T, Jaree P, et al. Anti-lipopolysaccharide factor isoform 3 from *Penaeus monodon* (ALFPm3) exhibits antiviral activity by interacting with WSSV structural proteins. *Antiviral Res*. 2014;110:142-150. doi:10.1016/j.antiviral.2014.08.005
146. Krusong K, Poolpipat P, Supungul P, Tassanakajon A. A comparative study of antimicrobial properties of crustinPm1 and crustinPm7 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*. 2012;36(1):208-215. doi:10.1016/J.DCI.2011.08.002
147. Chang Y-T, Lin C-Y, Tsai C-Y, et al. The New Face of the Old Molecules: Crustin Pm4 and Transglutaminase Type I Serving as RNPs Down-Regulate Astakine-Mediated Hematopoiesis. Datta PK, ed. *PLoS One*. 2013;8(8):e72793. doi:10.1371/journal.pone.0072793
148. Lin MC, Pan CY, Hui CF, Chen JY, Wu JL. Shrimp anti-lipopolysaccharide factor (SALF), an antimicrobial peptide, inhibits proinflammatory cytokine expressions through the MAPK and NF- κ B pathways in LPS-induced HeLa cells. *Peptides*. 2013;40:42-48. doi:10.1016/j.peptides.2012.11.010
149. Zhang X, Yuan J, Sun Y, et al. Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nat Commun* 2019 101. 2019;10(1):1-14. doi:10.1038/s41467-018-08197-4
150. Uengwetwanit T, Pootakham W, Nookaew I, et al. A chromosome-level assembly of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) genome facilitates the identification of growth-associated

- genes. *Mol Ecol Resour.* 2021;00:1-21. doi:10.1111/1755-0998.13357
151. Carriel-Gomes MC, Kratz JM, Barracco MA, Bachère E, Barardi CRM, Simões CMO. In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(4):469-472. doi:10.1590/S0074-02762007005000028
 152. Löfgren SE, Miletti LC, Steindel M, Bachère E, Barracco MA. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Exp Parasitol.* 2008;118(2):197-202. doi:10.1016/j.exppara.2007.07.011

Supplementary information:

Supplementary Table 1: Summary of minimal inhibitory concentrations (MIC) for crustaceans AMPs

AMPs	Gram-positive bacteria	Gram-negative bacteria	Fungi
crustins	<i>Bacillus megaterium</i> 1.25-2.5 μM [1] <i>Staphylococcus haemolyticus</i> 2.5-5 μM [1] <i>Aerococcus viridans</i> 0.312-0.625 μM [1] <i>Staphylococcus aureus</i> 3.13-6.25 μM [2] <i>Streptococcus iniae</i> 3.13-6.25 μM [2] <i>Corynebacterium glutamicum</i> 1.6-3.1 μM [3] <i>Micrococcus luteus</i> 0.62-1.25 μM [4] <i>Corynebacterium stationis</i> 1.25-2.5 μM [4] <i>Microbacterium maritypicum</i> 1.25-2.5 μM [4]	<i>Vibrio harveyi</i> 2.5-5 μM [1] <i>Klebsiella pneumoniae</i> 10-20 μM [1] <i>Escherichia coli</i> 2.5-5 μM [4] <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1.25-2.5 μM [4] <i>Vibrio anguillarum</i> 5 μM [4]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 12.5-25 μM [3]
ALFs	<i>Aerococcus viridans</i> 1.356-3.12 μM [5] <i>Bacillus megaterium</i> 0.19-0.39 μM [5] <i>Micrococcus luteus</i> 1.56-3.12 μM [5] <i>Corynebacterium stationis</i> 5-10 μM [6] <i>Microbacterium maritypicum</i> 5-10 μM [6] <i>Staphylococcus aureus</i> 10-20 μM [6] <i>Bacillus subtilis</i> 10-20 μM [6]	<i>Escherichia coli</i> 0.095-0.19 μM [5] <i>Klebsiella pneumoniae</i> 3.12-6.25 μM [5] <i>Salmonella typhimurium</i> 6.25-12.5 μM [5] <i>Vibrio alginolyticus</i> 0.39-0.78 μM [5] <i>Vibrio anguillarum</i> 0.78-1.56 μM [5] <i>Vibrio harveyi</i> 0.78-1.56 μM [5] <i>Enterobacter cloacae</i> 3.12-6.25 μM [5] <i>Erwinia carotovora</i> 1.56-3.12 μM [5] <i>Vibrio nigripulchritudo</i> 5-10 μM [6]	<i>Fusarium oxysporum</i> 1.56-3.12 μM [5] <i>Botrytis cinerea</i> 3.12-6.25 μM [5] <i>Penicillium crustosum</i> 12.5-25 μM [5] <i>Candida albicans</i> 10 μM [7]
penaeidins	<i>Bacillus megaterium</i> 2.5-5 μM [8] <i>Aerococcus viridans</i> 0.3-0.6 μM [8] <i>Staphylococcus aureus</i> 6.25 μM [9] <i>Micrococcus luteus</i> 0.78 μM [9] <i>Bacillus thuringiensis</i> 1.56 μM [9] <i>Bacillus cereus</i> 1.56 μM [9] <i>Bacillus subtilis</i> 6.25 μM [9]	<i>Escherichia coli</i> 2.5-5 μM [8] <i>Klebsiella pneumoniae</i> 3.13 μM [9]	<i>Nectria haematococca</i> 1.25-2.5 μM [8] <i>Neurospora crassa</i> 2.5-5 μM [8] <i>Alternaria brassicicola</i> 2.5-5 μM [8] <i>Botrytis cinerea</i> 5-10 μM [8] <i>Fusarium solani</i> 3.13 μM [9] <i>Fusarium oxysporum</i> 3.13 μM [9] <i>Gloeosporium album</i> 6.25 μM [9] <i>Verticillium dahliae</i> 3.13 μM [9]
stylicins	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> 2.5 μM [10]

PR-AMPs	<i>Micrococcus luteus</i> 0.78-1.56 μM [11]	<i>Escherichia coli</i> 12.5-25 μM [11] <i>Vibrio harveyi</i> 0.195-0.39 μM [11] <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 3.13-6.25 μM [11]	<i>nd</i>
GR-AMPs	<i>Micrococcus luteus</i> 12.5-25 μM [12] <i>Aerococcus viridans</i> 6.25-12.5 μM [12]	<i>na</i>	<i>nd</i>
arasins	<i>Micrococcus luteus</i> 0.39-0.78 μM [12] <i>Bacillus subtilis</i> 6.25-12.5 μM [12] <i>Aerococcus viridans</i> 0.195-0.39 μM [12] <i>Staphylococcus haemolyticus</i> 6.25-12.5 μM [12]	<i>Vibrio harveyi</i> 0.78-1.56 μM [12] <i>Vibrio anguillarum</i> 3.125-6.25 μM [12]	<i>nd</i>
hyastatins	<i>Corynebacterium glutamicum</i> 0.4 μM [13] <i>Micrococcus luteus</i> 1.25-2.5 μM [14] <i>Staphylococcus aureus</i> 0.63-1.25 μM [14] <i>Micrococcus lysodeikticus</i> 2.5-5 μM [14]	<i>Escherichia coli</i> 12.5 μM [13] <i>Pseudomonas stutzeri</i> 0.63-1.25 μM [14] <i>Pseudomonas fluorescens</i> 1.25-2.5 μM [14] <i>Aeromonas hydrophila</i> 1.25-2.5 μM [14]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 12.5 μM [13] <i>Candida albicans</i> 6.3-12.5 μM [13]
astacidins	<i>Micrococcus luteus</i> 5.44 μM [15] <i>Bacillus subtilis</i> 1.06 μM [15] <i>Bacillus megaterium</i> 1.06 μM [15] <i>Staphylococcus aureus</i> 2 μM [16]	<i>Shigella flexneri</i> 0.5 μM [15] <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4.24 μM [15] <i>Escherichia coli</i> 1 μM [16] <i>Acinetobacter baumannii</i> 2 μM [16]	<i>nd</i>
panusins	<i>Staphylococcus aureus</i> 0.7-1.7 μM [17] <i>Bacillus subtilis spizizenii</i> 2.3-2.9 μM [17]	<i>Escherichia coli</i> 0.9-1.5 μM [17] <i>Klebsiella pneumoniae</i> 1.0-1.8 μM [17]	<i>Candida albicans</i> 2-4 μM [17]
paralithocins	<i>Corynebacterium glutamicum</i> 12.5 μM [18] <i>Carnobacterium mobile</i> 12.5 μM [18] <i>Carnobacterium funditum</i> 12.5 μM [18]	<i>na</i>	<i>nd</i>
armadillidins	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> 2.37 μM [19] <i>Staphylococcus lentus</i> 4.75 μM [19] <i>Bacillus subtilis</i> 9.5 μM [19] <i>Bacillus pumilus</i> 4.75 μM [19] <i>Bacillus megaterium</i> 2.37 μM [19]	<i>Escherichia coli</i> 9.5 μM [19] <i>Pseudomonas syringae</i> 4.75 μM [19] <i>Aeromonas hydrophila</i> 9.5 μM [19] <i>Enterobacter cloacae</i> 9.5 μM [19] <i>Flavobacterium breve</i> 9.5 μM [19]	<i>Alternaria brassicicola</i> 7.6 μM [19]

In this table the minimum inhibitory concentration described in the reviewed literature is summarized for each family of crustacean AMPs. For details on AMPs sequence, microorganism strains and antimicrobial assay methodology please visit the reference cited. *na*: non-active; *nd*: non-determined

References:

1. Amparyup P, Kondo H, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol Immunol.* 2008;45(4):1085-1093. doi:10.1016/j.molimm.2007.07.031
2. Supungul P, Tang S, Maneeruttanarungroj C, et al. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.* 2008;32(1):61-70. doi:10.1016/j.dci.2007.04.004
3. Sperstad SV, Haug T, Paulsen V, et al. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Dev Comp Immunol.* 2009;33(4):583-591. doi:10.1016/J.DCI.2008.10.010
4. Bandeira PT, Vernal J, Matos GM, 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 Shellfish Immunol.* 2020;97:294-299. doi:10.1016/j.fsi.2019.12.055
5. Somboonwivat K, Marcos M, Tassanakajon A, et al. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.* 2005;29(10):841-851. doi:10.1016/j.dci.2005.02.004
6. Matos GM, Schmitt P, Barreto C, et al. Massive gene expansion and sequence diversification is associated with diverse tissue distribution, regulation and antimicrobial properties of anti-lipopolysaccharide factors in shrimp. *Mar Drugs.* 2018;16(10). doi:10.3390/md16100381
7. Rosa RD, Vergnes A, de Lorgeril J, et al. Functional Divergence in Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors (ALFs): From Recognition of Cell Wall Components to Antimicrobial Activity. *PLoS One.* 2013;8(7). doi:10.1371/journal.pone.0067937
8. Destoumieux D, Bullet P, Strub JM, Dorsselaer A, Bachère E. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem.* 1999;266(2):335-346. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00855.x.
9. Kang CJ, Xue JF, Liu N, Zhao XF, Wang JX. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol.* 2007;44(7):1535-1543. doi:10.1016/j.molimm.2006.08.025
10. 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(6):1269-1277. doi:10.1016/j.molimm.2009.12.007
11. Imjongjirak C, Amphaiphan P, Charoensapsri W, Amparyup P. Characterization and antimicrobial evaluation of SpPR-AMP1, a proline-rich antimicrobial peptide from the mud crab *Scylla paramamosain*. *Dev Comp Immunol.* 2017;74:209-216. doi:10.1016/j.dci.2017.05.003
12. Imjongjirak C, Amparyup P, Tassanakajon A. Two novel antimicrobial peptides, arasin-likeSp and GRPSp, from the mud crab *Scylla paramamosain*, exhibit the activity against some crustacean pathogenic bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 2011;30(2):706-712. doi:10.1016/j.fsi.2010.12.031
13. Sperstad SV, Haug T, Vasskog T, Stensvag K. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Mol Immunol.* 2009;46(13):2604-2612. doi.org/10.1016/j.molimm.2009.05.002
14. Shan Z, Zhu K, Peng H, et al. The new antimicrobial peptide sphyastatin from the mud crab *Scylla paramamosain* with multiple antimicrobial mechanisms and high effect on bacterial infection. *Front Microbiol.* 2016;7(JUL):1140. doi:10.3389/fmicb.2016.01140
15. Jiravanichpaisal P, Lee SY, Kim YA, Andrén T, Söderhäll I. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. *Dev Comp Immunol.* 2007;31(5):441-455. doi:10.1016/j.dci.2006.08.002
16. Rončević T, Čikeš-Čulić V, Maravić A, et al. Identification and functional characterization of the astacidin family of proline-rich host defence peptides (PcAst) from the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard 1852). *Dev Comp Immunol.* 2020;105:103574. doi:10.1016/j.dci.2019.103574
17. Montero-Alejo V, Corzo G, Porro-Suardiá J, et al. Panusin represents a new family of β -defensin-like peptides in invertebrates. *Dev Comp Immunol.* 2017;67:310-321. doi:10.1016/j.dci.2016.09.002
18. Moe MK, Haug T, Sydnes MO, et al. Paralithocins, Antimicrobial Peptides with Unusual Disulfide Connectivity from the Red King Crab, *Paralithodes camtschaticus*. *J Nat Prod.* 2018;81(1):140-150. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00780
19. Verdon J, Coutos-Thevenot P, Rodier MH, et al. Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. *Front Microbiol.* 2016;7(SEP). doi:10.3389/fmicb.2016.01484

(**A**) Primary structure of crustins (Type I: *carcininPm2* and *MjCruI-2*; Type IIa: Crustin *Lv* and *crusFpau*; Type IIb: *crustinPm7* and Crustin-like *Lv*; Type III: *LvSWD* and *PmSWD*; Type IV: *LvDWD* and *PmDWD*). Dashed lines indicate the structural domains: the glycine-rich region (blue), the cysteine-rich region (green) and the whey acidic protein (WAP) domain (red). (**B**) Primary structure of anti-lipopolsaccharide factors (ALF-A: *ALFPm2* and *Litvan* ALF-A; ALF-B: *ALFPm3* and *Litvan* ALF-B; ALF-C: *ALFPm6* and *Litvan* ALF-C; ALF-D: *ALFPm8* and *Litvan* ALF-D; ALF-E: *ALFPm9* and *Litvan* ALF-E; ALF-F: *ALFPm10* and *Litvan* ALF-F; ALF-G: *ALFPm11* and *Litvan* ALF-G). (**C**) Primary structure of the classic penaeidins (PEN1/2: *Litvan* PEN1/2 and *Farpau* PEN1/2; PEN3: *Litvan* PEN3, *Penmon* PEN3 and *Fenchi* PEN3; PEN4: *Litvan* PEN4 and *Farpau* PEN4; PEN5: *Penmon* PEN5 and *Fenchi* PEN5), *MjPen-II* and *BigPEN*. Dashed lines indicate the structural domains: the serine-rich region (blue), the repeat region (yellow), the proline/arginine-rich (PRP) region (red) and the cysteine-rich region (green). (**D**) Primary structure of stylicins (STY1: *Lvan-Stylicin1* and *Lsty-Stylicin1*; STY2: *Lvan-Stylicin2* and *Lsty-Stylicin2*; Stylicins from Asian species: *Pmon-Stylicin* and *Mjap-Stylicin*). Dashed lines indicate the structural domains: the PRP region (red) and the cysteine-rich region (green).

4. CAPÍTULO II: Novos fatores anti-lipopolissacarídeos em camarões peneídeos

No capítulo II é apresentada a divergência funcional de ALFs em camarões peneídeos. A partir de análises *in silico* em bancos de dados públicos foi possível identificar, caracterizar e classificar os ALFs de camarões peneídeos em sete grupos distintos (Grupos A a G). Ademais, foram identificados peptídeos relacionados a ALFs, aqui denominados de *ALFs-like*, que, possivelmente, derivaram de um gene ancestral de ALFs em táxons específicos. Utilizando a espécie *L. vannamei* como modelo, foi demonstrado que os ALFs compõem uma família altamente diversa de AMPs, em nível de sequência, expressão gênica e função. Este capítulo foi separado em duas seções: **Seção A** que reporta os resultados referentes aos ALFs (publicado na revista “*Marine Drugs*”, ISSN: 1660-3397); **Seção B** que apresenta os resultados referentes aos *ALFs-like* (peptídeos que apresentam assinaturas aminoacídicas similares a ALFs contendo três ou quatro resíduos de cisteína).

SEÇÃO A: Diversidade molecular e funcional de ALFs de camarões peneídeos.

SEÇÃO B: Identificação e caracterização molecular e transcricional de *ALFs-like* em camarões peneídeos.

SEÇÃO A: Diversidade molecular e funcional de ALFs de camarões peneídeos.

Research 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 Matos ¹, Paulina Schmitt ², Cairé Barreto ¹, Natanael Dantas Farias ¹, Guilherme de Toledo-Silva ³, Fanny Guzmán ⁴, Delphine Destoumieux-Garzón ⁵, Luciane Maria Perazzolo ¹ and Rafael Diego Rosa ^{1,*}

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

²Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2373223 Valparaíso, Chile.

³Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

⁴Núcleo Biotecnología Curauma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2373223 Valparaíso, Chile.

⁵Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia, 34090 Montpellier cedex 5, France.

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

DOI: <https://doi.org/10.3390/md16100381>

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 potent inhibitors of lipopolysaccharide (LPS)-induced clotting in marine chelicerates, the horseshoe crabs *Tachypleus tridentatus* and *Limulus polyphemus* [1]. In addition to their LPS-binding properties, they were also shown to be highly active against Gram-negative bacteria [2]. In the early 2000s, ALF homologues were identified in hemocyte transcriptomes from two penaeid shrimp, *Litopenaeus setiferus* and *Penaeus monodon* [3,4]. Although ALF sequences have been extensively identified in many species, these AMPs appear to be exclusive of marine chelicerates and crustaceans.

ALFs are genetically encoded as precursor molecules composed of a leader sequence followed by a mature peptide containing two conserved cysteine residues [5]. The three-dimensional structure of both horseshoe crab and shrimp ALFs consists of three α -helices packed against a four-stranded β -sheet [6]. In this structure, the two cysteines flank a central β -hairpin of 20 residues stabilized by a single disulfide bond. This central β -hairpin (also known as “LPS-binding domain” or LPS-BD) is the functional domain of ALFs and holds key charged amino acids involved in the recognition and binding of microbial cell wall components, such as LPS from Gram-negative bacteria, lipoteichoic acid from Gram-positive bacteria and β -glucans from fungi [7]. Indeed, the mechanism of action of ALFs is intimately associated with their ability to bind to those microbial moieties. Notably, ALFs are known to be highly active against a broad range of bacteria, fungi and some enveloped viruses [8].

Different from horseshoe crabs, ALFs form a diverse and multigenic family of AMPs in penaeid shrimp. Shrimp ALFs are composed of five members (Groups A to E), which differ in terms of primary structure and biochemical characteristics [5]. While ALFs from Groups A and D possess anionic properties, Groups B and C are exclusively composed of cationic peptides. Interestingly, while cationic ALFs exhibit potent antimicrobial activities against a broad range of bacterial and fungal strains [9], anionic ALFs from Group D have impaired antimicrobial properties [10]. The limited antibacterial activity of Group D ALFs is likely due to the lack of most residues involved in LPS binding of cationic ALFs from Group B [10]. Group E ALFs were only described in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* as cationic (MjALF-E1) and anionic (MjALF-E2) peptides, with antimicrobial activity restricted to Gram-negative bacteria [11].

At present, little is known about the evolutionary forces that may have shaped the diversification of ALF sequences in shrimp. To address this question and explore the biological implications of such sequence diversity, we combined a series of molecular, phylogenetic, transcriptional and functional analyses. By using an *in silico* mapping method, we have identified novel ALF members in different penaeid species. Bayesian phylogenetic reconstructions revealed the existence of seven ALF groups in shrimp: the previously described Groups A to E, and the novel Groups F and G evidenced here. Each ALF group is encoded by a different locus in the shrimp genome. Through a quantitative PCR-based approach, we have assessed the expression of the seven ALF genes in terms of tissue distribution and transcriptional response to two pathogens (*Vibrio harveyi* and WSSV), but also during different shrimp development stages (from fertilized eggs to larval and post-larval stages) in the shrimp *L. vannamei*. Finally, we evaluated the antimicrobial activity of synthetic peptides based on the central β -hairpin of the three novel ALFs identified in *L. vannamei* (Groups E to G) and presented evidence that the sequence diversity of shrimp ALFs can be reflected in their biological properties. Altogether, the tissue distribution, regulation and biological functions of ALF genes reveal that various evolutionary pressures have led to functional diversification of the ALF family in penaeid shrimp.

2. Materials and Methods

2.1. Database Searches and Phylogenetic Reconstructions

ALF sequences were methodically collected from publicly accessible databases and used for the search of homologous sequences in both annotated and non-annotated databases. Only full-length coding sequences were considered. Homology searches were performed using tBLASTx at NCBI. Exon-intron boundaries were defined by alignment of the cDNA and genomic sequences. All nucleotide sequences were manually inspected and analyzed using open-access bioinformatics tools. Three-dimensional models for *L. vannamei* ALFs were built with SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) using ALFPm3 NMR resolution (PDB: 2JOB1) as a template. Deduced amino acid sequences were aligned using MAFFT multiple alignment program (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Bayesian phylogenetic analysis was conducted in MrBayes 3.1.2 (<http://mrbayes.sourceforge.net/>), using WAG + G as substitution model, with two runs of 107 generations, sample rate of 1000 and burn-in of 25%. Neighbor-joining analysis was conducted in MEGA X [27]. Bootstrap sampling was reiterated

1000 times using a 50% bootstrap cutoff. Trees were drawn using FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.2. Animals and Tissue Collection

Litopenaeus vannamei juveniles (10 ± 2 g) and at different development stages were obtained from the Laboratory of Marine Shrimp (Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil). Each developmental stage was identified microscopically and collected as previously described [16] while juveniles were acclimated in controlled conditions for at least one week before any experimentation. Hemolymph was collected from the ventral sinus into a precooled modified Alsever solution (27 mM sodium citrate, 336 mM NaCl, 115 mM glucose, 9 mM EDTA, pH 7.0) and hemocytes were isolated by centrifugation. After hemolymph collection, the following tissues were harvested by dissection: foregut, hepatopancreas, midgut, hindgut, muscle, gills and nerve cord. Tissues were rinsed in Tris-saline solution (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7.4), homogenized in TRIzol reagent (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA) and processed for semiquantitative RT-PCR analysis.

2.3. Experimental Infections

Two unrelated shrimp pathogens were chosen for experimental infections, the Gram-negative *Vibrio harveyi* and the White spot syndrome virus (WSSV). For the bacterial infection, 6×10^7 CFU/animal of *V. harveyi* ATCC 14126 under 100 μ L sterile seawater (SSW) or 100 μ L SSW (injury control) were injected. For the viral infection, shrimp were injected with 100 μ L of a WSSV inoculum containing 3×10^2 viral particles. The WSSV inoculum was prepared from muscle tissues of WSSV-infected shrimp as previously described [14]. Animals injected with 100 μ L of a tissue homogenate prepared from WSSV-free shrimp were used as injury control for the viral infection. At 48 h post-infections, hemocytes were collected, pooled (three pools of five animals per condition) and processed for gene expression analysis. *Naïve* (non-stimulated) animals were used as a control for all experimental conditions.

2.4. Semiquantitative RT-PCR Analysis for Tissue Distribution of Gene Expression

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA samples were treated with DNase I (Thermo Scientific) at 37 °C for 15 min and precipitated with 0.3 M sodium acetate (pH 5.2) and isopropanol (1:1; v:v). RNA amount and quality were assessed by spectrophotometric

analysis and the integrity of total RNA was analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis. First strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using the RevertAid Reverse Transcription kit (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA) and oligo(dT)₁₂₋₁₈ primers. PCR reactions were carried out in a 15-µL reaction volume containing 1 µL cDNA, 2 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP Mix, 0.4 µM of each primer (Table 1) and 1 U Taq DNA Polymerase (Sinapse, São Paulo, SP, Brazil). PCR conditions were as follows: 1 cycle of denaturation at 95 °C for 10 min followed by 30–35 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. PCR products were analyzed by electrophoresis (1.5% agarose gel) and stained by ethidium bromide. The expression of the LvActin gene was used as endogenous control.

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this study.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon
<i>LvActin</i> ¹	TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG	TCACCAACTGGGATGACATGG	846 bp
<i>LvActin</i> ²	CCACGAGACCACCTACAAC	AGCGAGGGCAGTGATTTTC	142 bp
<i>LvEF1α</i> ²	TGGCTGTGAACAAGATGGACA	TTGTAGCCCACCTTCTTGACG	103 bp
<i>LvL40</i> ²	GAGAATGTGAAGGCCAAGATC	TCAGAGAGAGTGC GACCATC	104 bp
<i>LvRpS6</i> ²	AGCAGATACCCTTGGTGAAG	GATGCAACCACGGACTGAC	193 bp
<i>Litvan ALF-A</i> ^{1,2}	CTGATTGCTCTTGTGCCACG	TGACCCATGAACTCCACCTC	113 bp
<i>Litvan ALF-B</i> ^{1,2}	GTGTCTCCGTGTTGACAAGC	ACAGCCCAACGATCTTGCTG	123 bp
<i>Litvan ALF-C</i> ^{1,2}	ATGCGAGTGTCTGTCCTCAG	TGAGTTTGTTCGCGATGGCC	115 bp
<i>Litvan ALF-D</i> ^{1,2}	TGTGTTGGTTGTGGCACTGG	CAACGAGGTCAATGTCACCG	131 bp
<i>Litvan ALF-E</i> ^{1,2}	TGCTACGTGAATCGCAGTCC	CGCTTCTCTTCCGACAATG	100 bp
<i>Litvan ALF-F</i> ^{1,2}	AAGCTCTCATTCCTGGTCGG	GGGTGTAACGAAGTACGTGC	180 bp
<i>Litvan ALF-G</i> ^{1,2}	CCGCTGCATGTCAAGTATCC	TCAGCAGTAGCAGTGT CAGC	140 bp

¹Primers for semiquantitative analysis of gene expression (RT-PCR)

²Primers for quantitative analysis of gene expression (RT-qPCR)

2.5. Fluorescence-Based Reverse Transcription Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR amplifications were performed in a final volume of 15 µL containing 0.3 µM of each primer (Table 1), 7.5 µL of reaction mix (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2×; Thermo Scientific, Asheville, NC, USA) and 1 µL of cDNA. The RT-qPCR program was 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Melt curve analysis was performed to evaluate primer specificity. The eukaryotic translation elongation factor 1-alpha (*LvEF1α*) and the ribosomal protein *LvL40* were used as reference genes of expression data in hemocytes. Relative transcript levels were determined by the comparative standard curve method using a standard curve derived from 2-fold dilution series of a cDNA pool of all samples. Differences we considered significant at $p < 0.05$ (one-way ANOVA and

Tukey's multiple comparison test). Gene expression of ALFs during shrimp development was assessed in twelve developmental stages as previously described [16].

2.6. Peptide Synthesis, Oxidation and Characterization

Synthetic peptides based on the central β -hairpin of ALF-E (*Litvan* ALF-E₃₂₋₅₃: GCYVNRSPYLKKFEVHYRADVKCG), ALF-F (*Litvan* ALF-F₃₀₋₅₁: GCTYFVTPKVKSFEYFKGRMTCG) and ALF-G (*Litvan* ALF-G₃₄₋₅₅: GCSYSTRPYFLRWRLKFKSKVWCG) were obtained in a Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer (CEM Corp, Matthews, NC, USA) using Fmoc-protected amino acids (Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany) and Rink Amide AM resin (loading: 0.6 meq/g). Fmoc deprotection was carried out with 20% v/v piperidine in DMF, couplings were performed with DIC/OxymaPure activation (1/1 eq) and additional couplings with TBTU/DIEA/OxymaPure activation (1/2/1 eq). Peptides were cleaved with TFA/TIS/DOT/H₂O (92.5/2.5/2.5/2.5) [trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/2,2-(ethylenedioxy)-diethanethiol/ultrapure water] and purified by RP-HPLC (JASCO Corp., Tokyo, Japan) on a XBridge™ BEH C18 column (100 × 4.6 mm, 3.5 μ m) (Waters Corp., Milford, MA, USA) with a 0–70% acetonitrile-water mixture gradient over 30 min at a flow rate of 1 mL/min. Peptides were further lyophilized and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry in a LCMS-2020 ESI-MS (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) to confirm their molecular masses.

Then, peptides were oxidized as previously reported [28]. In brief, 5 mg of the crude peptide were first reduced with 10% β -mercaptoethanol (95 °C for 5 min) then dissolved in 50% (v/v) AcOH/H₂O and later diluted in 32 mL of oxidation buffer (2 mM guanidinium chloride, 10% isopropyl alcohol and 10% dimethyl sulfoxide). The pH was adjusted to 5.8 with ammonium hydroxide. The peptide solution was subjected to air oxidation at room temperature for 18 h. The peptide solution was then acidified to pH 2.5 and purified using a SPE C18 (Waters Corp., Milford, MA, USA). The peptides were eluted with 5%, 20%, 40%, 60% and 80% acetonitrile in 0.05% TFA ultrapure water at a flow rate of 1 mL/min. The fractions were collected, and the acetonitrile was evaporated on a Savant SPD 1010 SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA). The fractions were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry.

2.7. Antibacterial and Antifungal Assays

The antimicrobial activity of synthetic peptides was assayed against the Gram-positive bacteria *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Brevibacterium stationis* CIP 101282, *Microbacterium maritypicum* CIP 105733, *Micrococcus luteus* CIP 5345 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, the Gram-negative bacteria *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, *Escherichia coli* SBS363, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749, *Vibrio anguillarum* ATCC 19264, *Vibrio harveyi* ATCC 14126 and *Vibrio nigripulchritudo* CIP103195, the yeast *Candida albicans* MDM8 and the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*.

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined in duplicate by the liquid growth inhibition assay, as previously described [29]. MIC values are expressed as the lowest concentration tested that causes 100% growth inhibition. Poor Broth (PB: 1% peptone, 1% NaCl, pH 7.2) was used for standard bacteria, while PB supplemented with 0.5 M NaCl (PB–NaCl) was used as a culture medium for *Vibrio* strains. For *B. stationis* and *M. maritypicum* cultures, PB–NaCl medium was supplemented with 20 mM KCl, 5 mM MgSO₄ and 1.5 mM CaCl₂. Potato dextrose broth (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil) at half strength was used for cultures of *F. oxysporum* while Sabouraud medium (1% peptone, 4% glucose, pH 5.6) was used for yeast cultures. The growth of bacteria and yeast was monitored spectrophotometrically ($\lambda = 595$ nm), while *F. oxysporum* hyphae formation was observed in an inverted microscope. After MIC determination, bacterial cultures were plated in nutrient agar for 24–48 h for the determination of the bactericidal activity of the synthetic peptides.

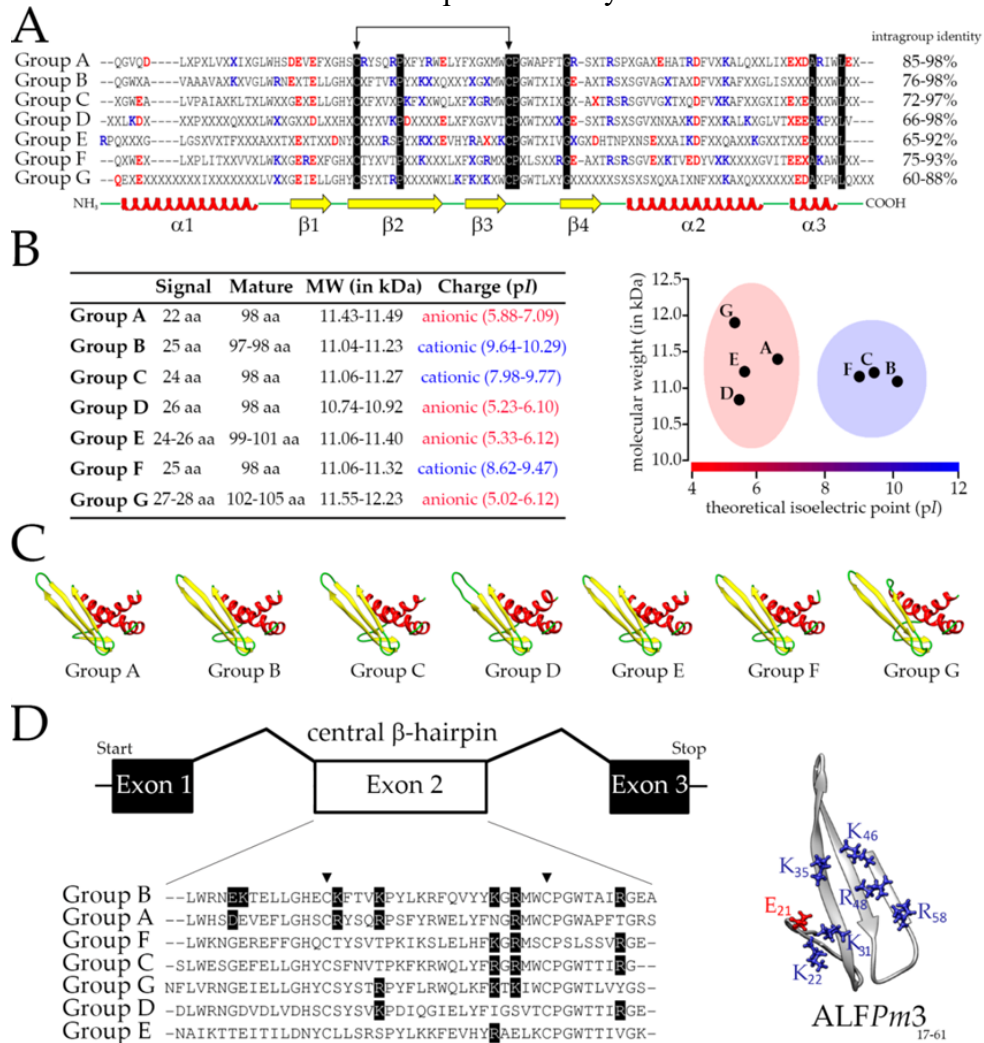
3. Results

3.1. ALFs from Penaeid Shrimp Comprise a Diverse Family Composed of Seven Members

By using an exhaustive *in silico* screening approach, we recovered 47 unique ALF sequences (complete CDS) from both publicly available annotated and non-annotated databases for 10 penaeid shrimp species (Decapoda: Penaeidae). With all predicted amino acid sequences in hand, we performed multiple alignments in order to classify the obtained sequences into the five previously described ALF groups (Groups A to E). Surprisingly, from our sequence analysis, shrimp ALFs clustered into seven distinct groups with specific amino acid sequence signatures (Figure 1A). In addition to already documented ALFs from Groups A to E, we identified here two novel groups that were conveniently named Group F and G (Figure 1A).

Across shrimp species, ALFs corresponded to full-length transcripts that encode for precursors composed of a signal peptide (22 to 28 residues), followed by a mature peptide (10.74 to 12.23 kDa) containing two conserved cysteine residues (Figure 1A). Besides their differences in size and molecular weight, shrimp ALFs also displayed contrasting electrostatic characteristics. Notably, while ALFs from Groups B, C and F showed cationic properties, Groups A, D, E and G were composed of anionic ALFs (Figure 1B). However, independently of their differences in primary structure and biochemical properties, the seven ALFs shared a similar three-dimensional architecture: three α -helices packed against a four-stranded β -sheet (Figure 1C). Members of the seven groups were identified in at least four different shrimp species (*Farfantepenaeus aztecus*, *L. vannamei*, *M. japonicus* and *P. monodon*). Remarkably, Group G ALFs were the only members that were not identified in the genus *Fenneropenaeus* (*F. chinensis*, *F. indicus* and *F. penicillatus*). On the other hand, two different members from Group C were identified in *F. chinensis* (*FcALF2*: JX853775 and *FcALF3*: JX853776), *M. japonicus* (*MjALF-C1*: AB210110 and *MjALF-C2*: KU160498) and *P. monodon* (*ALFPm6*: JN562340 and *ALFPm7*: KX431031).

Our knowledge of ALF intraspecific sequence diversity was also enriched by the discovery of novel sequences in *F. aztecus* (Groups A to G), *F. penicillatus* (Groups A to F), *L. vannamei* (Groups E to G) and *P. monodon* (Groups D to G). Besides, according to our *in silico* analyses, some ALFs from *M. japonicus* were classified in a different Group to that previously categorized by Jiang and colleagues [11]. For instance, the sequence *MjALF-A2* [11] is actually a member of Group G and not an ALF from Group A, whereas the cationic *MjALF-D1* (GenBank: KU160499) belongs to Group F and not to Group D (which gathers anionic sequences only). More surprisingly, the sequence *MjALF-E1* (GenBank: KY627760), previously classified as a cationic member of Group E, did not fit in any ALF Group. Indeed, its mature sequence contains an additional cysteine residue (apart of the two cysteines holding the central β -hairpin structure) that is not found in ALFs from either marine chelicerates or crustaceans. Interestingly, coding sequences related to *MjALF-E1* were also found in *P. monodon* and *L. vannamei*. Unlike the three-cysteine-containing sequences from *M. japonicus* and *P. monodon*, the sequences identified in *L. vannamei* contain four cysteines.

Figure 1. The seven members of the shrimp ALF family.

(A) Multiple alignments of the consensus amino acid signature of each ALF member (Groups A to G) found in penaeid shrimp. Identical residues are highlighted in black while “X” indicates any amino acid. Positively and negatively charged residues are displayed in blue and red, respectively. The conserved cysteine bond is indicated by the arrows. The position of α -helices (red helices) and β -sheets (yellow arrows) is based on the three-dimensional (3D) structure of ALFPm3 (PDB: 2JOB). Intragroup amino acid identity values are indicated on the right. (B) Biochemical properties of shrimp ALFs. MW: molecular weight; pI: theoretical isoelectric point; aa: amino acid residues. (C) Predicted 3D structure of *L. vannamei* ALFs. The structural models were built based on the NMR (nuclear magnetic resonance) structure of ALFPm3. (D) Not-to-scale schematic representation of ALF genes from *P. monodon*: Group A (ALFPm2: EF523561), Group B (ALFPm3: EF523562), Group C (ALFPm6: JN562340), Group D (ALFPm8: NIUS010164210), Group E (ALFPm9: NIUS010076396), Group F (ALFPm10: NIUS011801312) and Group G (ALFPm11: NIUS010749450). Boxes represent the exons, and lines represent the introns. Multiple alignments of the amino acid sequences encoded by the exon 2 (white box). Triangles (\blacktriangledown) indicate the two conserved cysteines. Residues involved in LPS binding of ALFPm3 are highlighted in black.

3.2. ALF Sequence Diversity Is Gene-Encoded

To gain insights into the origin of the molecular diversity of the shrimp ALF family, we searched for ALF gene sequences in both annotated (GenBank Nucleotide) and non-annotated (Whole-Genome Shotgun Contigs) databases. From our *in silico* mining analysis, seven unique genomic sequences were identified in *P. monodon*: ALFPm2 from Group A (GenBank:

EF523561), ALF*Pm3* from Group B (GenBank: EF523562), ALF*Pm6* from Group C (GenBank: JN562340), ALF*Pm8* from Group D (GenBank: NIUS010164210), ALF*Pm9* from Group E (GenBank: NIUS010076396), ALF*Pm10* from Group F (GenBank: NIUS011801312) and ALF*Pm11* from Group G (GenBank: NIUS010749450). Each genomic sequence corresponded to a specific ALF member and we found no evidences that ALFs from different Groups could be encoded by a same genomic sequence.

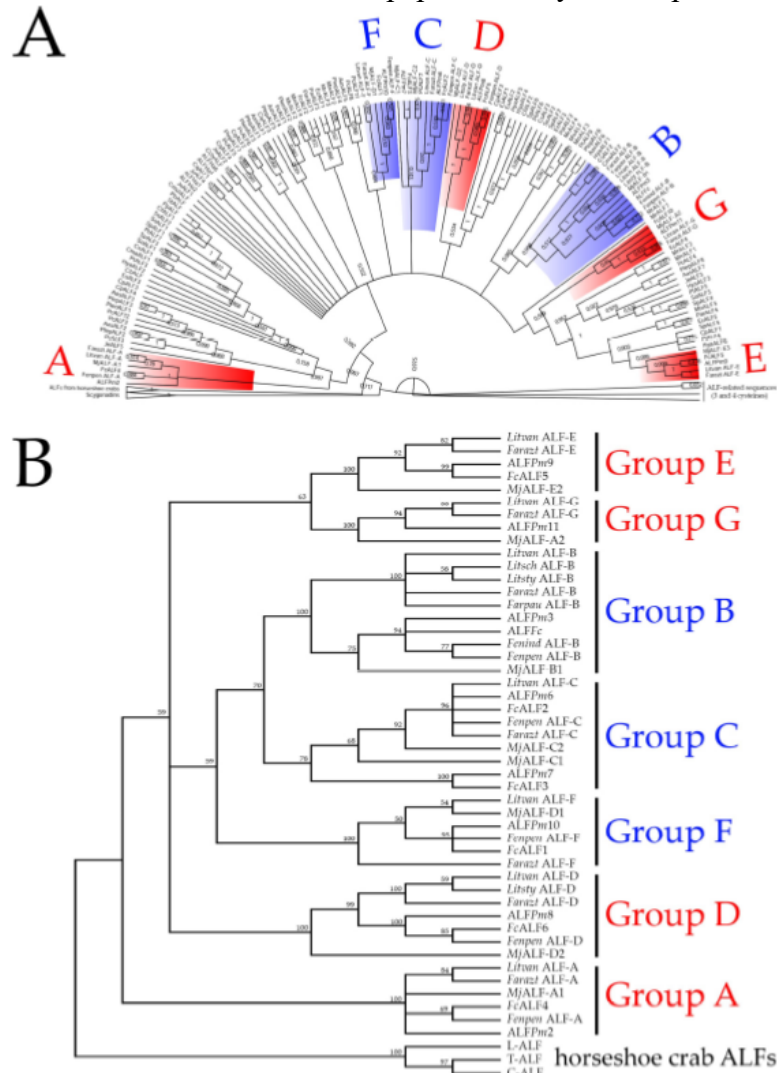
Despite their differences in terms of sequence signatures, all genes shared a similar structural organization: three exons interrupted by two introns (Figure 1D). Every sequence presents a second exon that encodes the four stranded β -sheets, with the two cysteines delimiting the central β -hairpin. This structure holds the seven charged residues involved in LPS binding and is considered as the functional domain of ALFs. As shown in Figure 1D, not all *P. monodon* ALFs contain those conserved residues found in ALF*Pm3* from Group B [6]. Regarding the other gene regions, the first exon covers the 5'-untranslated region (UTR), the leader sequence and the hydrophobic N-terminal portion of the mature peptide (the first α -helix), and the third exon encodes the two C-terminal α -helices of the mature peptide and the 3'-UTR.

3.3. ALFs Evolved from Gene Duplication Events before Shrimp Speciation

In order to unravel the phylogenetic relationships of the shrimp ALFs, phylogenetic reconstructions were performed with ALF sequences from 38 species of decapod crustaceans (suborders Dendrobranchiata and Pleocyemata) and three species of marine chelicerates (the horseshoe crabs *Carcinoscorpius rotundicauda*, *L. polyphemus* and *T. tridentatus*). Additionally, we analyzed the ALF-related sequences containing three and four cysteine residues and scygonadins (anionic AMPs from crabs that contain two cysteines flanking 17 amino acid residues [12]). Our Bayesian phylogenetic analysis revealed that ALFs comprise a large and diverse gene family in decapod crustaceans. The first striking piece of information is that the three/four-cysteine-containing peptides (including *Mj*ALF-E1), as well as scygonadins, are not authentic members of the ALF family since they form a separate and distant clade from all other sequences (Figure 2A). Indeed, the ALF clade gathered sequences from both crustaceans and marine chelicerates. Regarding the crustacean group, ALFs were split into two main clades (Figure 2A). The first clade included ALFs from Group A, while the second clade gathered ALFs from six additional groups (B to G). Interestingly, sequences from non-peneaid

species (Pleocyemata) were found in all shrimp ALF groups, but they also formed exclusive groups distinct from those found in penaeids (Figure 2A).

Figure 2. ALFs form a diverse antimicrobial peptide family in decapod crustaceans.



(A) Bayesian and (B) neighbor-joining trees of ALFs from decapod crustaceans and marine chelicerates (horseshoe crabs). Cationic and anionic ALF groups from penaeid shrimp are displayed in blue and red, respectively. Posterior probabilities (Bayesian) and bootstrap values (neighbor-joining) higher than 50% are shown in the nodes. The list of the ALF sequences included in analyses (annotations, sequences and GenBank accession numbers) is provided in <https://www.mdpi.com/1660-3397/16/10/381/s1>.

Then, an additional phylogenetic tree was constructed to determine the phylogenetic relationships among the seven shrimp ALF groups (A to G) (Figure 2B). In this tree, shrimp ALFs clustered into two main clades: a first clade containing ALFs from Group A and a second clade divided into three branches. Within the second clade, all cationic shrimp ALFs (Groups B, C and F) clustered into one branch, and anionic ALFs from Groups E and G clustered into a second branch (Figure 2B). Group D ALFs clustered in a third branch (Figure 2B). Altogether,

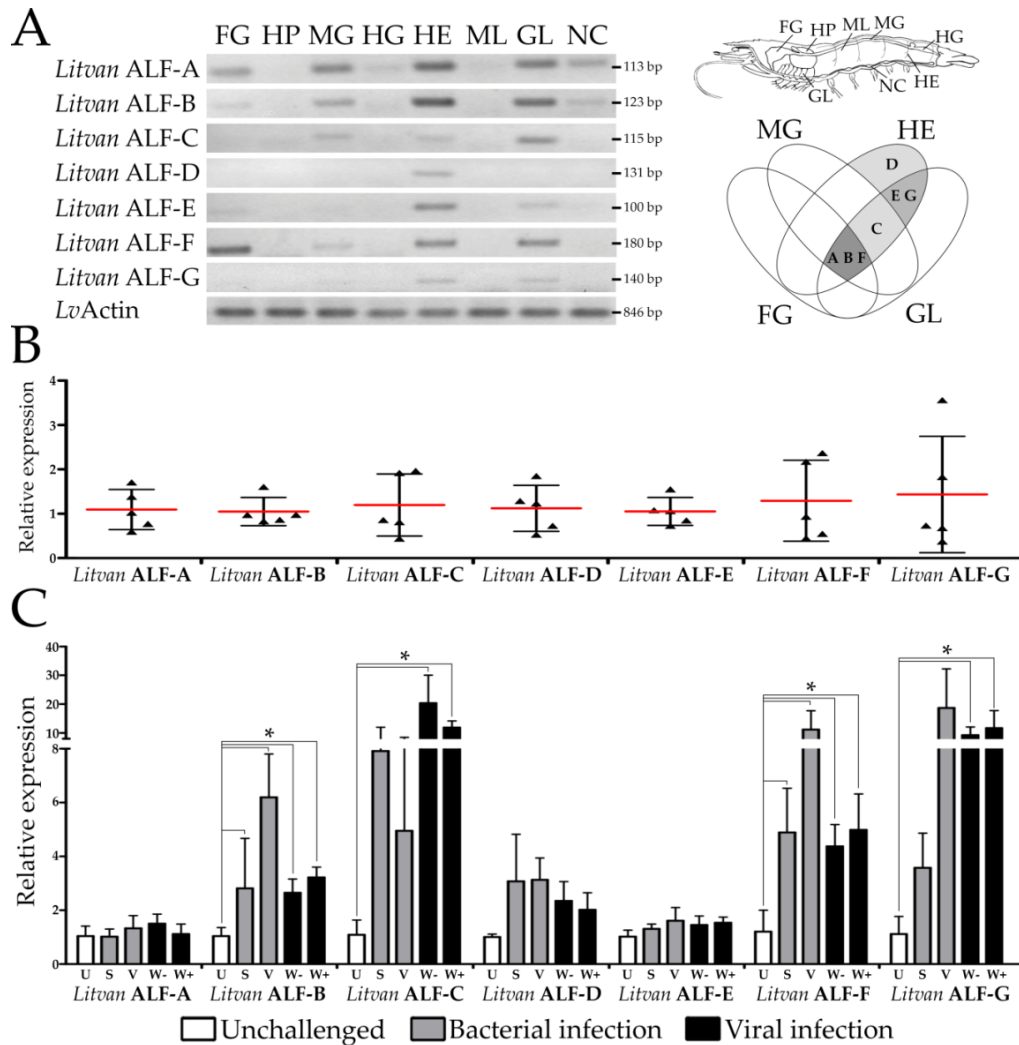
our results suggest that the sequence diversity found in the ALF family was likely driven by gene duplication events before the divergence of decapod crustaceans (Dendrobranchiata and Pleocyemata). Notably, the gene expansion and subsequent diversification of the ALF family seems to have occurred in crustaceans and not in marine chelicerates. Actually, in marine chelicerates, only one ALF type was identified.

3.4. ALFs Are All Expressed in Individual Shrimps and Differentially Modulated in Response to Tissue Damage

We further focused on the transcriptional profiles of shrimp ALFs in terms of tissue distribution. For gene expression analyses, we considered the seven ALFs from the Pacific white shrimp *L. vannamei* (*Litvan* ALF-A to -G). First, the gene expression distribution of *Litvan* ALFs was assessed in eight different tissues of healthy juveniles by semiquantitative RT-PCR analysis. Overall, *Litvan* ALFs were mainly detected in circulating hemocytes and gills (Figure 3A). Transcripts of *Litvan* ALF-A and *Litvan* ALF-B were detected in foregut, midgut, hemocytes, gills and nerve cord, while the expression of *Litvan* ALF-C was observed in midgut, hemocytes, and gills (Figure 3A). Besides, while the expression of *Litvan* ALF-E and *Litvan* ALF-G was exclusively detected in hemocytes and gills, *Litvan* ALF-F was mainly expressed in the foregut (Figure 3A). Unlike the other ALF groups, the expression of *Litvan* ALF-D was only detected in hemocytes (Figure 3A). For all genes, no signals were observed in hepatopancreas, hindgut and muscle (Figure 3A).

ALF gene expression was then studied in response to infections and wounding. We first asked whether ALF genes were all transcribed in a single animal or whether their diversity reflected inter-individual sequence variability. Transcripts of the seven ALF genes were detected in the circulating hemocytes of every individual shrimp, as determined by RT-qPCR (Figure 3B). However, important variation was observed in the basal transcription of each gene among individuals (Figure 3B). While the basal gene expression of *Litvan* ALF-A to *Litvan* ALF-F varied from 2- to 6-fold among individuals, variations up to 11.3-fold were found for *Litvan* ALF-G gene expression (Figure 3B).

Figure 3. Tissue expression distribution of shrimp ALFS and gene modulation in hemocytes in response to pathogen challenge and tissue damage.



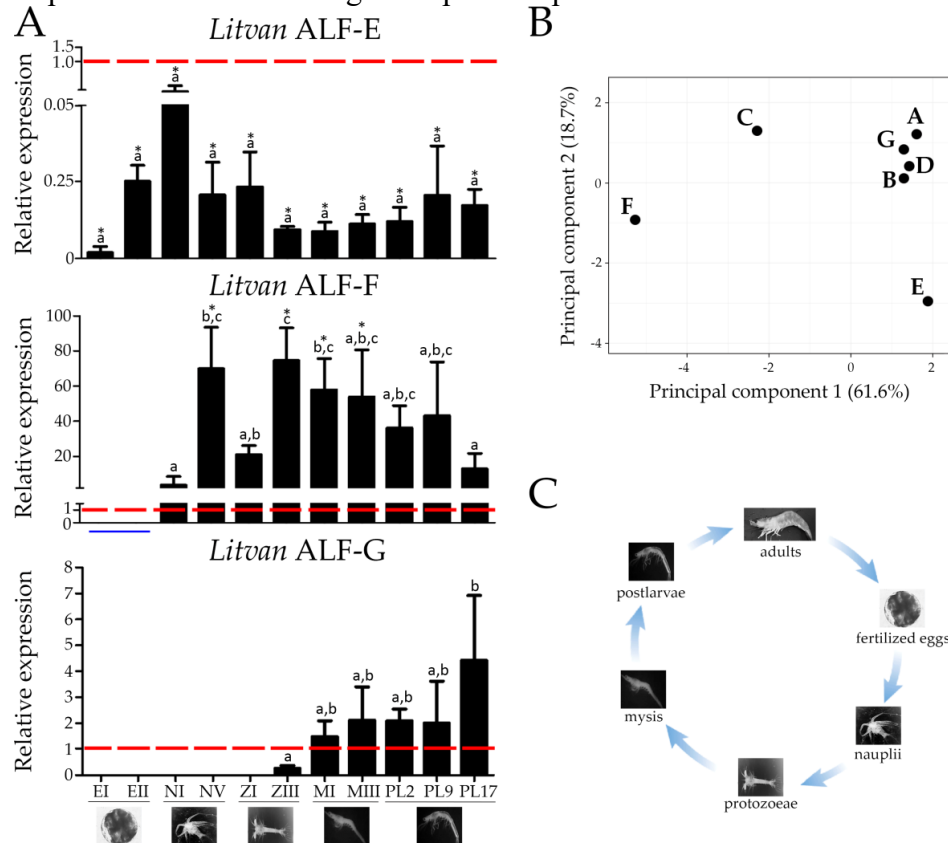
(A) Semiquantitative RT-PCR analysis of *L. vannamei* ALFs in shrimp tissues: foregut (FG), hepatopancreas (HP), midgut (MG), hindgut (HG), hemocytes (HE), muscle (ML), gills (GL) and nerve cord (NC). The expression of the *LvActin* gene was used as endogenous control. The anatomic location of the tissues is indicated in the shrimp image. The Venn diagram summarizes the main sites of expression of *L. vannamei* ALFs. (B) mRNA basal levels of *L. vannamei* ALFs in the circulating hemocytes from five individual shrimp. (C) Gene expression profile of ALFs in the hemocytes of shrimp at 48 h after experimental infections with *V. harveyi* (grey bars) or WSSV (black bars). 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, $p < 0.05$). N: naive (non-stimulated) shrimp (white bars), S: sterile seawater injury control, V: *V. harveyi* ATCC 14126 (6×10^7 CFU/animal), W-: tissue homogenate inoculum prepared from WSSV-free shrimp, W+: WSSV (3×10^2 viral particles/animal).

Next, we analyzed the gene expression profile of *Litvan* ALFs in response to microbial challenge and injury. Two unrelated shrimp pathogens were chosen: the Gram-negative *V. harveyi* and the White spot syndrome virus (WSSV). The transcriptional response of *Litvan* ALFs was quantified by RT-qPCR in shrimp hemocytes 48 h after infections. This time point was chosen on the basis of previous studies from our group [13,14,15]. Anionic ALFs from

Groups A, D and E did not respond to pathogens nor to injury (Figure 3C). Conversely, cationic ALFs (Groups B, C and F) and the anionic Group G ALF showed significant changes in expression only in response to tissue injury. Indeed, the expression of *Litvan* ALF-B (2.6-fold), *Litvan* ALF-C (18.7-fold), *Litvan* ALF-F (3.6-fold) and *Litvan* ALF-G (8.3-fold) was significantly induced in circulating hemocytes after the injection of a tissue homogenate prepared from shrimp muscle (Figure 3C). Similarly, the expression of *Litvan* ALF-B (2.7-fold) and *Litvan* ALF-F (4.1-fold) also increased after the injection of sterile seawater. The pathogens (*V. harveyi* and WSSV) did not modulate further ALF expression. Notably, independently of the experimental condition, a high variability in gene expression was observed for all ALFs (Figure 3C).

3.5. Some ALF Genes Are Transcribed Early in Shrimp Development, while Others Are Mainly Expressed in Juveniles

Finally, we studied the expression of the three new *L. vannamei* ALFs (Groups E, F and G) at different stages of shrimp development: fertilized eggs, nauplii, protozoae, mysis, postlarvae and juveniles. The expression profile of *Litvan* ALFs from Groups A to D was previously reported [16]. Three distinct patterns of expression were observed for ALF groups E to G over *L. vannamei* development. ALFs from Groups E and F were detected at all developmental stages, but Group F expression could only be quantified from nauplius stages (Figure 4). Group E expression did not vary significantly over the entire shrimp development, from larvae to juveniles. In contrast, Group F expression was maximum in protozoa III (ZIII) and then decreased significantly in juveniles (PL17) (Figure 4). Finally, Group G ALF was only expressed from protozoa III (ZIII), and its expression increased significantly up to juvenile stages (PL17) (Figure 4).

Figure 4. Expression of ALFs during shrimp development.

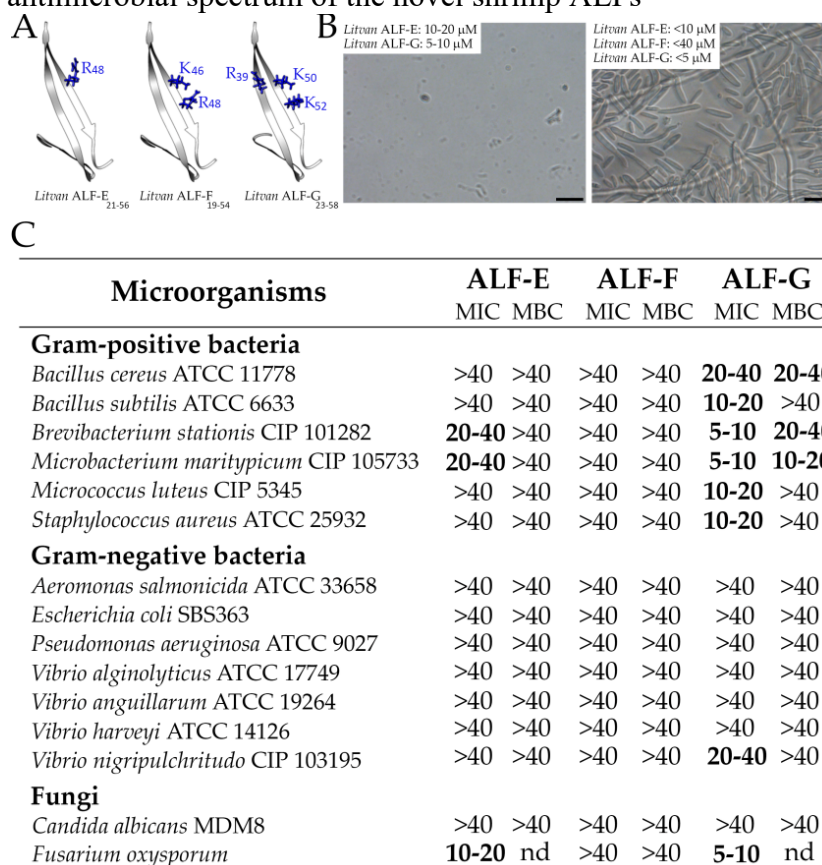
(A) Gene expression profile of *Litvan* ALF-E, -F and -G in twelve developmental stages: fertilized eggs at 0–4 h post-spawning (EI), fertilized eggs at 7–11 h post-spawning (EII), nauplius I (NI), nauplius V (NV), protozoa I (ZI), protozoa III (ZIII), mysis I (MI), mysis III (MIII), postlarva 2 (PL2), postlarva 9 (PL9), postlarva 17 (PL17). Representative images of the developmental stages are indicated at the bottom of the graph. Results are present as mean \pm standard deviation. The red dotted line indicates the expression in hemocytes from juveniles while the solid blue underline highlights the stages at which the expression was detected (valid dissociation curve) but not quantified (Cq values higher than the limit of quantification). Different letters indicate significant differences among the developmental stages and asterisks (*) shows significant differences between each developmental stage and hemocytes from juveniles (one-way ANOVA/Tukey, $p < 0.05$). (B) Results of principal component analysis showing the relationship among the expression profile of *L. vannamei* ALFs during shrimp development. (C) The life cycle of the Pacific white shrimp *L. vannamei*.

3.6. Sequence Diversity of Shrimp ALFs Results in Distinct Antimicrobial Properties

The functional domain (central β -hairpin) of the three novel ALF members identified in *L. vannamei* (Groups E, F and G) was generated by chemical synthesis to evaluate their antimicrobial properties. Indeed, this functional domain is considered a good proxy of the full-length ALF antimicrobial properties [9,10,17]. Minimal inhibitory concentration assays were performed against Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi (yeast and filamentous) (Figure 5). From the three synthetic peptides, *Litvan* ALF-G₃₄₋₅₅ displayed the broadest range of antimicrobial activity, being effective against all tested Gram-positive bacteria, the Gram-negative *V. nigrispulchritudo* and the filamentous fungus *F. oxysporum* (Figure 5). This peptide could also affect the growth of the Gram-negative bacteria *E. coli* and *V. harveyi* at 40 μ M (data

not shown), but total inhibition was only observed against *V. nigripulchritudo*. Additionally, *Litvan* ALF-G₃₄₋₅₅ exhibited bactericidal activity against the Gram-positive bacteria *B. cereus*, *B. stationis* and *M. maritypicum*. On the other hand, synthetic β -hairpins of *Litvan* ALF-E₃₂₋₅₃ could inhibit only the growth of marine Gram-positive bacteria (*B. stationis* and *M. maritypicum*) and *F. oxysporum* (Figure 5). Notably, no antimicrobial activity was observed for *Litvan* ALF-F₃₀₋₅₁ β -hairpin even at 40 μ M. None of the synthetic peptides was able to inhibit the growth of the Gram-negative bacteria *A. salmonicida*, *P. aeruginosa*, *V. alginolyticus* and *V. anguillarum*, and of the yeast *C. albicans*. Thus, according to their synthetic β -hairpin, Group G and to a lower extent Group E ALFs show a broad spectrum of antimicrobial activities, whereas Group F is devoid of antifungal and antibacterial activity. However, in agreement with a very poor conservation of residues involved in LPS binding (Figure 1D), ALFs from Groups E–G were almost inactive against Gram-negative bacteria (Figure 5C).

Figure 5. The antimicrobial spectrum of the novel shrimp ALFs



(A) Predicted three-dimensional structure of the central β -hairpin of *Litvan* ALF-E, -F and -G. The structural models were built based on the NMR structure of ALFPm3 (PDB: 2JOB). Conserved residues involved in LPS binding of ALFPm3 are displayed in blue. (B) Representative images of the effects of ALFs against *F. oxysporum*: (B1) fugal spore inhibition (antifungal effect); (B2) fungal spore germination (no antifungal activity). Bars = 20 μ m. (C) Spectrum of antibacterial and antifungal activities of synthetic peptides based on the central β -hairpin of *Litvan* ALF-E, -F and -G. Minimum inhibitory (MIC) and Minimum bactericidal (MBC) concentrations are expressed in μ M. nd: non-determined.

4. Discussion

We showed here that shrimp ALFs are composed of seven distinct members (Groups A to G) with contrasting biochemical properties, activities and expression patterns. Particularly, ALF sequences were found to vary from cationic to anionic with important consequences on their antimicrobial activities. Overall, ALFs comprise the most diverse AMPs found in penaeid shrimp. Indeed, such diversity has not been observed in any other gene-encoded AMP families from shrimp, which are exclusively composed of cationic (penaeidins and crustins) or anionic (stylicins) members [8,12]. ALF diversity is encoded by at least seven genes that arose from successive duplications and subsequent mutations (nucleotide substitutions and insertion/deletion events) before decapod crustacean speciation occurred. This indicates that strong evolutionary pressures have driven the functional diversification of ALF genes, giving rise to neo- or sub-functionalization and retention in the shrimp genome.

We found that shrimp ALFs are paralogous genes that evolved before the speciation of the suborder Dendrobranchiata (penaeid shrimp). Indeed, ALF diversity, which is the subject of the present study, goes beyond penaeid shrimp and extends to other decapod species from the suborder Pleocyemata (including crayfish, crabs, lobsters, freshwater prawns, etc.). Some ALF members from non-penaeid decapods fall into the seven groups characterized here for penaeid shrimp. However, the ALF diversity found in the suborder Pleocyemata is different from penaeid shrimp (Dendrobranchiata). It is likely that the remarkable gene expansion and diversification of ALF sequences through gene duplication and subsequent mutation have fueled adaptation to different lifestyles and environments (and their associated pathogens) among crustaceans. Here, we have focused our study on shrimp ALFs, as a good sub-representative of ALF diversity. In order to support our hypothesis, we showed that the biological activities and expression patterns of ALF genes have diverged. In particular, we found that some ALFs are antimicrobial, whereas others are not. Some are expressed early during shrimp development, whereas others are expressed in late developmental stages. Finally, ALFs differ in their tissue distribution and responses to tissue damage. However, much more biological data are still needed on the expression and functions of the different ALF members to understand ALF evolution. This ambitious objective will require the development and use of emerging gene-silencing technologies (such as CRISPR-Cas9 and RNA interference) to achieve specific invalidation of closely-related genes in crustaceans and further phenotyping. Similarly, molecular tools such as *in situ* hybridization could reveal the tissue specificity of ALFs and thus, they would help in uncovering other biological functions. Finally, a

classification of all crustacean ALFs (from both decapod and non-decapod species) based on robust phylogenetic reconstructions may avoid misleading classifications and lead to consensus among researchers.

With the identification of two novel ALF groups, we found that ALFs from Groups E and G share a common ancestor gene. Interestingly, Group G is lacking in species of the genus *Fenneropenaeus* whereas it is found in species of the genera *Farfantepenaeus*, *Litopenaeus*, *Marsupenaeus* and *Penaeus*. Although it cannot be ruled out that data are missing from publicly accessible databases, the absence of Group G in *Fenneropenaeus* could result from a gene loss event within this genus. Alternatively, the duplication event that originated these two genes may not have occurred in the genus *Fenneropenaeus*. Indeed, the evolutionary history of each group traced a particular trajectory in each shrimp species. For instance, while Group C ALFs from *F. chinensis* (*Fc*ALF2 and *Fc*ALF3 [17]), *M. japonicus* (*Mj*ALF-C1 and *Mj*ALF-C2 [11]) and *P. monodon* (*ALFPm*6 and *ALFPm*7 [18,19]) are composed of two members, in other penaeids this group appears to be composed by a single gene. However, we do not favor this last hypothesis as Group G is found in a diversity of penaeid species. Interestingly, in *L. vannamei*, Group G ALF was shown here to (i) have broader and more potent antimicrobial activity than Group E ALF, according to their β -hairpin activity, and (ii) to be expressed at late developmental stages whereas Group E expression tends to decrease over ontogenesis. Therefore, it is tempting to speculate that Group E confers antimicrobial protection at larval stages when Group G is still not expressed, whereas Group G provides a selective advantage to the *Litopenaeus* genus in facing infections at juvenile and adult stages when they are more exposed to different environmental challenges.

We showed that the expression of the seven ALF genes is simultaneous in the circulating hemocytes of a single shrimp. This result is particularly interesting because it suggests that the different ALF members may act synergistically to improve their antimicrobial properties. However, it is still unknown whether they are produced by the same hemocyte populations. Comparatively, the different penaeidin members of *L. vannamei* (*Litvan* PEN1/2, -3 and -4) are constitutively expressed by the granular cell populations [20]. Although the expression of ALFs has been detected in hemocytes from juveniles, some members (Groups C, E and F) appeared to be transcribed in larval stages of shrimp development that precede the emergence of these immune cells [21]. Instead, the expression of ALFs from Groups A, B, D and G was quite similar to that observed for other shrimp AMPs that are exclusively produced by hemocytes [16]. On the one hand, the expression of ALFs early in development could be the result of

maternal transmission [16,22] but, on the other hand, those transcripts might originate from other shrimp tissues. Interestingly, in different species, including *L. vannamei*, the expression of ALFs from Groups C and F was mainly detected in other tissues (digestive system, gills, eyestalk) than in the circulating hemocytes [17,18,19]. However, only the expression of ALFs from Group B (ALFPm3 from *P. monodon*) was studied by immune staining [23]. More knowledge about the precise sites of ALF production will contribute to understand the involvement of these AMPs in shrimp epithelial defenses, especially those occurring in gills and intestines [15].

One important finding from this study concerns the differential gene expression pattern of shrimp ALFs in response to various challenges. Indeed, the different ALF genes found across penaeids showed to be responsive to various shrimp pathogens, from viruses to bacteria and filamentous fungi [11,14,15,18]. Moreover, RNA interference (RNAi)-mediated gene silencing assays have confirmed that ALFs are directly involved in shrimp survival to infectious diseases [18,24,25]. Additionally, our results provided new evidences for the role of ALFs in other biological processes. Interestingly, while ALFs from Groups A, D and E were not regulated, the expression of the other ALF genes was induced in response to tissue damage. Particularly, ALFs from Groups C and G were shown to be responsive to a tissue homogenate prepared from shrimp muscle (injury control for the WSSV infection), suggesting that they can be modulated by danger/damage-associated molecular patterns (DAMPs). This nonspecific transcriptional response could be associated with additional biological roles involving the promotion of wound healing and the rapid regeneration of tissues [20]. Additionally, we showed that some ALFs are modulated in the shrimp gut in response to infections, suggesting that ALFs can act as a first line of defense in tissues continuously exposed to microbe-rich environments [15,19]. Therefore, it is possible that those ALF variants have evolved novel functions associated with the control of the intestinal microbiota. The shrimp intestinal microbiota is a complex and dynamic community that is directly influenced by both biotic and abiotic factors [13], but probably it is also by the constitutive expression of immune-related genes. In fact, RNAi experiments revealed that ALFs from Groups B [18] and C [25] play an essential role in the control of the bacterial communities residing in the hemolymph. However, more functional genomic studies are required to understand the role of ALF in shrimp intestinal defenses.

Another relevant conclusion taken is that the antimicrobial activity of the functional domain of ALFs (central β -hairpin) is associated with its primary sequence rather than to its charge. Despite their differences in primary structure and biochemical features, the seven ALF

groups shared a similar tertiary structure. However, the residues involved in LPS binding are not conserved among the seven groups, confirming the neo-functionalization hypothesis proposed by Rosa and colleagues [10]. Indeed, LPS binding has been demonstrated for the limulus ALF sequence, which shares a common ancestor with all shrimp ALFs. Taking into account previous studies [9,10,11,17] and the present results, shrimp ALFs have proved to display a diverse spectrum of antimicrobial activity. While some members exhibited a broad range of antimicrobial activity (Groups B and G), some others displayed limited (Groups A, C and E) or very weak action (Groups D and F). One possible explanation is that the effectiveness of the antimicrobial activity of each ALF group is directly proportional to the amount of positively charged amino acids in its central β -hairpin structure [26]. However, we showed that the highly cationic central β -hairpin structure of *Litvan* ALF-F₁₉₋₅₄ (pI = 9.24) was not active against the microorganisms tested in this study. Likewise, synthetic β -hairpins of the *Fc*ALF1 (Group F) from *F. chinensis* was also poorly active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [17]. Thus, besides their overall net charge, other features may interfere directly on their biological activities. Given these results, the determination of the amino acid residues involved in the interaction with other microbial surface molecules (peptidoglycan, lipoteichoic acid, β -glucans, etc.) may provide valuable information of the mechanism of action of ALFs against other microorganisms beyond Gram-negative bacteria [7].

5. Conclusions

In conclusion, the combination of our molecular, transcriptional and functional data revealed that ALFs comprise the most diverse AMP family found in penaeid shrimp. We showed that they are composed of seven members encoded by different genes that follow a diverse pattern of expression. Our results also strongly suggest that the expansion and diversification of shrimp ALFs have shaped novel functions for this AMP family beyond their primary antibacterial properties. Thus, ALFs represent an attractive model to explore the impacts of the molecular diversity of immune-related genes on host–microbe interactions. Finally, ALFs possess the broadest spectrum of antimicrobial activity when compared to other shrimp AMPs. These bioactive peptides undoubtedly show biotechnological potential for the development of novel antibiotics derived from AMPs, as well as for the development of selective breeding programs.

References

1. Tanaka, S.; Nakamura, T.; Morita, T.; Iwanaga, S. Limulus anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of Limulus coagulation system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *105*, 717–723.
2. Morita, T.; Ohtsubo, S.; Nakamura, T.; Tanaka, S.; Iwanaga, S.; Ohashi, K.; Niwa, M. Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). *J. Biochem.* **1985**, *97*, 1611–1620.
3. Gross, P.S.; Bartlett, T.C.; Browdy, C.L.; Chapman, R.W.; Warr, G.W. 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*. *Dev. Comp. Immunol.* **2001**, *25*, 565–577.
4. Supungul, P.; Klinbunga, S.; Pichyangkura, R.; Jitrapakdee, S.; Hirono, I.; Aoki, T.; Tassanakajon, A. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar. Biotechnol.* **2002**, *4*, 487–494.
5. Tassanakajon, A.; Rimphanitchayakit, V.; Visetnan, S.; Amparyup, P.; Somboonwiwat, K.; Charoensapsri, W.; Tang, S. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Dev. Comp. Immunol.* **2018**, *80*, 81–93.
6. Yang, Y.; Boze, H.; Chemardin, P.; Padilla, A.; Moulin, G.; Tassanakajon, A.; Pugniere, M.; Roquet, F.; Destoumieux-Garzón, D.; Gueguen, Y.; et al. NMR structure of rALF-Pm3, an anti-lipopolysaccharide factor from shrimp: Model of the possible lipid A-binding site. *Biopolymers* **2008**, *91*, 207–220.
7. Schmitt, P.; Rosa, R.D.; Destoumieux-Garzón, D. An intimate link between antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2016**, *1858*, 958–970.
8. Destoumieux-Garzón, D.; Rosa, R.D.; Schmitt, P.; Barreto, C.; Vidal-Dupiol, J.; Mitta, G.; Gueguen, Y.; Bachère, E. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2016**, *371*, 20150300.
9. Somboonwiwat, K.; Marcos, M.; Tassanakajon, A.; Romestand, B.; Gueguen, Y. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* **2005**, *29*, 841–851.
10. Rosa, R.D.; Vergnes, A.A.; de Lorgeril, J.; Goncalves, P.; Perazzolo, L.M.; Sauné, L.; Romestand, B.; Fievet, J.; Gueguen, Y.; Bachère, E.; et al. Functional divergence in shrimp anti-lipopolysaccharide factors (ALFs): from recognition of cell wall components to antimicrobial activity. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67937.
11. Jiang, H.-S.; Zhang, Q.; Zhao, Y.-R.; Jia, W.-M.; Zhao, X.-F.; Wang, J.-X. A new group of anti-lipopolysaccharide factors from *Marsupenaeus japonicus* functions in antibacterial response. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *48*, 33–42.
12. Rosa, R.D.; Barracco, M.A. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebr. Surviv. J.* **2010**, *7*, 262–284.
13. Pilotto, M.; Goncalves, A.; Vieira, F.; Seifert, W.; Bachère, E.; Rosa, R.; Perazzolo, L. Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms* **2018**, *6*, 83.
14. Goncalves, P.; Guertler, C.; Bachère, E.; de Souza, C.R.B.; Rosa, R.D.; Perazzolo, L.M. Molecular signatures at imminent death: hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. *Dev. Comp. Immunol.* **2014**, *42*, 294–301.
15. Silveira, A.S.; Matos, G.M.; Falchetti, M.; Ribeiro, F.S.; Bressan, A.; Bachère, E.; Perazzolo, L.M.; Rosa, R.D. 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.
16. Quispe, R.L.; Justino, E.B.; Vieira, F.N.; Jaramillo, M.L.; Rosa, R.D.; Perazzolo, L.M. Transcriptional profiling of immune-related genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ontogenesis. *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *58*, 103–107.
 17. Li, S.; Guo, S.; Li, F.; Xiang, J. Functional Diversity of Anti-Lipopolysaccharide Factor Isoforms in Shrimp and Their Characters Related to Antiviral Activity. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 2602–2616.
 18. Ponprateep, S.; Tharntada, S.; Somboonwiwat, K.; Tassanakajon, A. Gene silencing reveals a crucial role for anti-lipopolysaccharide factors from *Penaeus monodon* in the protection against microbial infections. *Fish Shellfish Immunol.* **2012**, *32*, 26–34.
 19. Soonthornchai, W.; Chaiyapechara, S.; Klinbunga, S.; Thongda, W.; Tangphatsornruang, S.; Yoocha, T.; Jarayabhand, P.; Jiravanichpaisal, P. Differentially expressed transcripts in stomach of *Penaeus monodon* in response to AHPND infection. *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *65*, 53–63.
 20. Destoumieux, D.; Muñoz, M.; Cosseau, C.; Rodriguez, J.; Bulet, P.; Comps, M.; Bachère, E. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 461–469.
 21. Muñoz, M.; Vandenbulcke, F.; Gueguen, Y.; Bachère, E. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* **2003**, *27*, 283–289.
 22. Barreto, C.; Coelho, J.R.; Yuan, J.; Xiang, J.; Perazzolo, L.M.; Rosa, R.D. 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.
 23. Somboonwiwat, K.; Bachère, E.; Rimphanitchayakit, V.; Tassanakajon, A. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. *Dev. Comp. Immunol.* **2008**, *32*, 1170–1176.
 24. De la Vega, E.; O’Leary, N.; Shockey, J.E.; Robalino, J.; Payne, C.; Browdy, C.L.; Warr, G.W.; Gross, P.S.; O’Leary, N.A.; Shockey, J.E.; et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. *Mol. Immunol.* **2008**, *45*, 1916–1925.
 25. Wang, X.W.; Xu, J.D.; Zhao, X.F.; Vasta, G.R.; Wang, J.X. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 11779–11790.
 26. Tassanakajon, A.; Somboonwiwat, K.; Amparyup, P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *48*, 324–341.
 27. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549.
 28. Alvarez, C.A.; Guzmán, F.; Cárdenas, C.; Marshall, S.H.; Mercado, L. Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, *41*, 93–101.
 29. Hetru, C.; Bulet, P. Strategies for the Isolation and Characterization of Antimicrobial Peptides of Invertebrates. *Methods Mol. Biol.* **1997**, *78*, 35–49.

SEÇÃO B: Identificação e caracterização molecular e transcricional de *ALFs-like* em camarões peneídeos

1. Introdução

Além dos ALFs, peptídeos que apresentam assinaturas aminoacídicas semelhantes, como as scygonadinas e peptídeos relacionados a ALFs contendo mais de dois resíduos de cisteínas (*ALFs-like*), têm sido identificados em crustáceos. As scygonadinas são peptídeos aniônicos que apresentam estrutura gênica e peptídeo maduro semelhantes aos ALFs (HUANG *et al.*, 2006; YEDERY; REDDY, 2009; QIAO *et al.*, 2016). No entanto, esses peptídeos foram descritos apenas em caranguejos do gênero *Scylla* e são expressos principalmente no ducto ejaculatório de machos durante o período de acasalamento e nos primeiros estágios de desenvolvimento embrionário (XU *et al.*, 2011). De maneira similar, sequências de *ALFs-like* foram identificadas exclusivamente em camarões peneídeos (JIANG *et al.*, 2015; Capítulo II, Seção A). Atualmente, pouco se conhece acerca da diversidade, perfil de expressão e papel biológico desses peptídeos e não está clara a sua relação filogenética com os ALFs. Dessa maneira, na **Seção B** deste capítulo serão apresentadas a caracterização e a classificação da diversidade molecular de *ALFs-like* encontrados em peneídeos e a sua relação filogenética com os ALFs autênticos. Ademais, os tecidos envolvidos na expressão desses peptídeos e o seu envolvimento nas respostas de defesa de *L. vannamei* frente a infecções por patógenos de interesse aquícola foram também investigados.

2. Materiais e Métodos

2.1. Análises *in silico*

A partir das sequências nucleotídicas e aminoacídicas de ALFs de camarões peneídeos encontradas na seção anterior e de sequências de scygonadinas (GenBank: AAW57403, ABM05493, ABI96918), foi realizada uma busca por novos ALFs nos genomas disponíveis de *L. vannamei* (GenBank: GCA_003789085.1), *P. monodon* (GenBank: GCA_015228065.1) e *M. japonicus* (GenBank: GCA_002291165.1). As buscas foram feitas utilizando as ferramentas tBLASTx e tBLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) no banco *Reference RNA sequences* (RefSeq_rna). Também foram feitas buscas de sequências similares em diferentes espécies de crustáceos nos bancos de dados não anotados *Expressed Sequence Tags* (ESTs), *Transcriptome Shotgun Assembly* (TSA) e *Whole Genome Shotgun Contigs* (WGS). As sequências aminoacídicas deduzidas foram analisadas em relação à presença de peptídeo

sinal pela ferramenta SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) enquanto que a predição do ponto isoelétrico teórico (pI) e da massa molecular (MM) dos peptídeos maduros foi realizada com a ferramenta ExpASy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>). As sequências aminoacídicas dos peptídeos maduros foram alinhadas utilizando a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e as árvores filogenéticas foram geradas com o programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018). Para a construção da árvore filogenética, foi utilizado o método de *Maximum Likelihood* (pairwise deletion) com 1.000 replicatas (*bootstraps*) e o modelo de substituição Le Gascuel. A árvore gerada foi editada com o programa FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

Diferentes bibliotecas de RNAseq de *L. vannamei* (tecidos: SRR6327812, SRR1951370, SRR6147939, SRR1407787, SRR2060962, SRR2060963; maturação dos ovários: SRR2060963, SRR2060964, SRR2060965; estágios do desenvolvimento: SRR1460493, SRR1460494, SRR1460495, SRR1460504 e SRR1460505) foram baixadas do banco de dados SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) usando a ferramenta SRA toolkit v2.10.5 (<http://ncbi.github.io/sra-tools/>). A qualidade dos *reads* foi verificada utilizando a ferramenta FastQC v0.11.9 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e qualquer sequência de adaptador, assim como, bases com qualidade inferior a 30 foram removidas usando a ferramenta Trimmomatic v0.39 (BOLGER *et al.*, 2014). A análise de expressão gênica foi realizada utilizando o pacote RSEM v1.3.3 (LI; DEWEY, 2011). Os *reads* filtrados foram mapeados no transcrito de referência deduzido do genoma disponível de *L. vannamei* (GenBank: GCA_003789085.1) utilizando a ferramenta STAR v2.7.3 (DOBIN *et al.*, 2013). Os valores de expressão foram normalizados pelo RSEM para transcritos por milhão (TPM).

2.2. Animais

Camarões juvenis da espécie *L. vannamei* (10 ± 2 g), de ambos os sexos e aparentemente sadios, foram cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC/CCA/LCM) do Departamento de Aquicultura da UFSC e transportados para o setor de aquários do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA). Os animais foram mantidos em aquários com aeração constante e água salgada renovada diariamente em 30%. Os animais foram alimentados *ad libitum*, duas vezes ao dia, com ração comercial e aclimatados por sete dias antes da realização dos experimentos.

2.3. Coleta de tecidos

Foram coletados nove diferentes tecidos/órgãos de três animais juvenis: hemolinfa, músculo, brânquias, cordão nervoso, pedúnculo ocular, hepatopâncreas, intestino anterior (estômago), intestino médio, e intestino posterior. A hemolinfa foi extraída da região ventral do abdome na presença da solução anticoagulante MAS (Solução 35 de Alsever Modificada: 115 mM glicose, 336 mM NaCl, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) na proporção de 1:2 (hemolinfa:MAS) e agrupado em *pools* de três animais. Após a coleta, a hemolinfa foi centrifugada ($1.500 \times g$ por 10 min a 4°C) e o precipitado celular, correspondente aos hemócitos, suspenso em 1 mL de TRIzol (ThermoFisher Scientific) para extração do RNA total. Em seguida, os camarões foram sacrificados por hipotermia (banho de gelo por 10 min) para coleta dos demais tecidos. Cada tecido foi coletado independentemente, lavado em solução Tris-NaCl gelada (10 mM Tris, 330 NaCl, pH 7,4) agrupado em *pools* de três animais e macerados em 1 mL de TRIzol (ThermoFisher Scientific) com auxílio de pistilos estéreis. Os macerados de tecido foram centrifugados ($12.000 \times g$ por 10 min a 4°C) e os sobrenadantes armazenados a -20°C para posterior extração de RNA total.

Para análise das porções do intestino médio, o intestino médio ($n=3$) de animais estimulados e não-estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (infecção *per os* – item 2.4) foi coletado com auxílio de bisturi e lavado em Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4). Em seguida, as amostras de intestino médio foram seccionadas com bisturi em três porções iguais: porção anterior, medial e posterior. Após a coleta, as amostras foram maceradas em TRIzol (ThermoFisher Scientific) conforme descritos acima e armazenados a -20°C para extração de RNA total.

2.4. Infecções experimentais

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

protocolo adaptado de GONCALVES *et al.*, (2014) a partir de tecido muscular de camarões diagnosticados positivos para o WSSV. Para as infecções virais, os animais (n=15) foram injetados intramuscularmente, entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais da região dorsal, com 100 µL do inóculo viral (3×10^2 partículas virais/animal). A dose utilizada foi previamente padronizada como capaz de matar 50% dos animais infectados em sete dias (SILVEIRA *et al.*, 2018). Como controle foram utilizados animais não-estimulados (n=15; Grupo “*Naïve*”) e animais injetados com tecido muscular de camarões livres de WSSV (n=15; Grupo “*WSSV-free*”). Após os desafios, os animais foram mantidos em condições controladas por 48 h até a realização da coleta da hemolinfa e do intestino médio. A coleta dos tecidos foi realizada em 3 *pools* de 5 animais/condição, conforme descrito no item 2.3.

A infecção experimental *per os* foi realizada seguindo a metodologia descrita por PILOTTO e colaboradores (2018), porém utilizando a bactéria Gram-negativa *V. harveyi* ATCC 14126. A cultura de *V. harveyi* foi preparada em meio LB-NaCl (0,5% extrato de levedura, 1% peptona, 3% NaCl, pH 7,2) e incubada a 20°C durante 12 horas sob agitação. Após esse período, a cultura foi centrifugada a $1000 \times g$ por 10 min e suspensa em água do mar filtrada (0,22 µm). A densidade óptica da suspensão bacteriana foi ajustada para $DO_{600nm} = 2,5$ (correspondente a $1,5 \times 10^7$ CFU/mL). Em seguida, com auxílio de uma pipeta, foram inseridos no aparelho bucal dos camarões (n=3), 50 µL da suspensão bacteriana (aproximadamente $7,5 \times 10^5$ CFU/animal). Como controle, foram inseridos no aparelho bucal de outros camarões (n=3) 50 µL de água do mar estéril. Após 21 horas da infecção, os animais foram anestesiados (gelo por 10 min) e sacrificados. O intestino médio dos animais foi coletado com auxílio de bisturi e seccionado conforme detalhado no item 2.3.

2.5. Extração de RNA e síntese de cDNA

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

extraído foi feita por espectrofotometria (NanoVue Plus), enquanto a integridade das amostras foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para a síntese de DNA complementar (cDNA), foi realizada a transcrição reversa de 1 µg de RNA total utilizando o kit RevertAid Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

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

As reações de Transcrição Reversa seguida de PCR convencional (RT-PCR) foram realizadas utilizando-se 1 µL de cDNA (diluído 10 vezes), 0,2 µM de cada iniciador (Quadro 1), 0,4 mM de dNTP Mix, 2 mM de MgCl₂ e 1 U da enzima Taq DNA Polimerase (Sinapse Biotecnologia). Para a amplificação das sequências de *ALFs-like*, foi realizada uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 30 ou 35 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturação, 60°C por 30 s para hibridização dos iniciadores e 72°C por 30 s para extensão e, por fim, uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min. O gene da β-actina (*LvActina* - Quadro 1) foi utilizado como controle de expressão e de qualidade das amostras. Para a amplificação da sequência da β-actina, foi realizada uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 40 s, 56°C por 40 s e 72°C por 40 s e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

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

As reações de Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas utilizando-se o sistema StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em duplicata, utilizando 1 µL de cDNA (diluído 10 vezes para amostras de hemócitos e 20 vezes para amostras de intestino médio), 0,2 µM de cada iniciador (Quadro 1) e 7,5 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2× (ThermoFisher Scientific). Ao término dos ciclos, foi realizada uma curva de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s) das amostras para verificar a especificidade dos iniciadores. Para o cálculo de expressão relativa foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Nas análises de expressão gênica frente a infecções experimentais, os resultados foram normalizados pela média geométrica de dois genes de referência (*LvActina* e *LvRpS6*; Quadro 1) e calibrados com os valores de ΔCq do grupo “*Naïve*” (animais não-estimulados). Para as análises de comparação da expressão gênica entre as diferentes porções do intestino médio, foi utilizada como condição calibradora a média aritmética das três porções. Para as análises de

comparação de expressão gênica de uma mesma porção do intestino médio (anterior, medial ou posterior) entre animais infectados e não infectados, foi utilizada como condição calibradora a média da expressão gênica dos animais não infectados. Os dados de RT-qPCR foram analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey no programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software). As diferenças entre os grupos com variações de expressão inferiores a 1,5 vezes e com valor de $P < 0,05$ não foram consideradas significativas. Os gráficos de expressão relativa ao longo do desenvolvimento foram gerados no programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software).

Quadro 1 – Sequência dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica.

Gene	Referência [n° GenBank]	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Produto de amplificação
<i>LvActina</i> (RT-PCR)	CADORET <i>et al.</i> , (1999) [AF300705]	Fw:TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG Rv:TCACCAACTGGGATGACATGG	846 pb
<i>LvActina</i> (RT-qPCR)	WANG <i>et al.</i> , (2007) [AF300705]	Fw:CCACGAGACCACCTACAAC Rv:AGCGAGGGCAGTGATTTC	142 pb
<i>LvRpS6</i>	GONCALVES <i>et al.</i> , (2014) [FE080516]	Fw:AGCAGATACCCTTGGTGAAG Rv:GATGCAACCACGGACTGAC	193 pb
<i>LvALF-3cys</i>	[XM_027362708.1]	Fw:GTGTTTCATATCACTGGTCCG Rv:ATAAGGCATCCAGTCCTTCG	174 pb
<i>LvALF-4cys</i>	[XM_027358404.1]	Fw:TTGCTCGGCATCTTCTTGGG Rv:CACAGGTGAAAGTGCACTGG	126 pb

LvRpS6: proteína ribossomal S6. **Fw**: sequência do iniciador senso. **Rv**: sequência do iniciador antisense. **pb**: pares de base

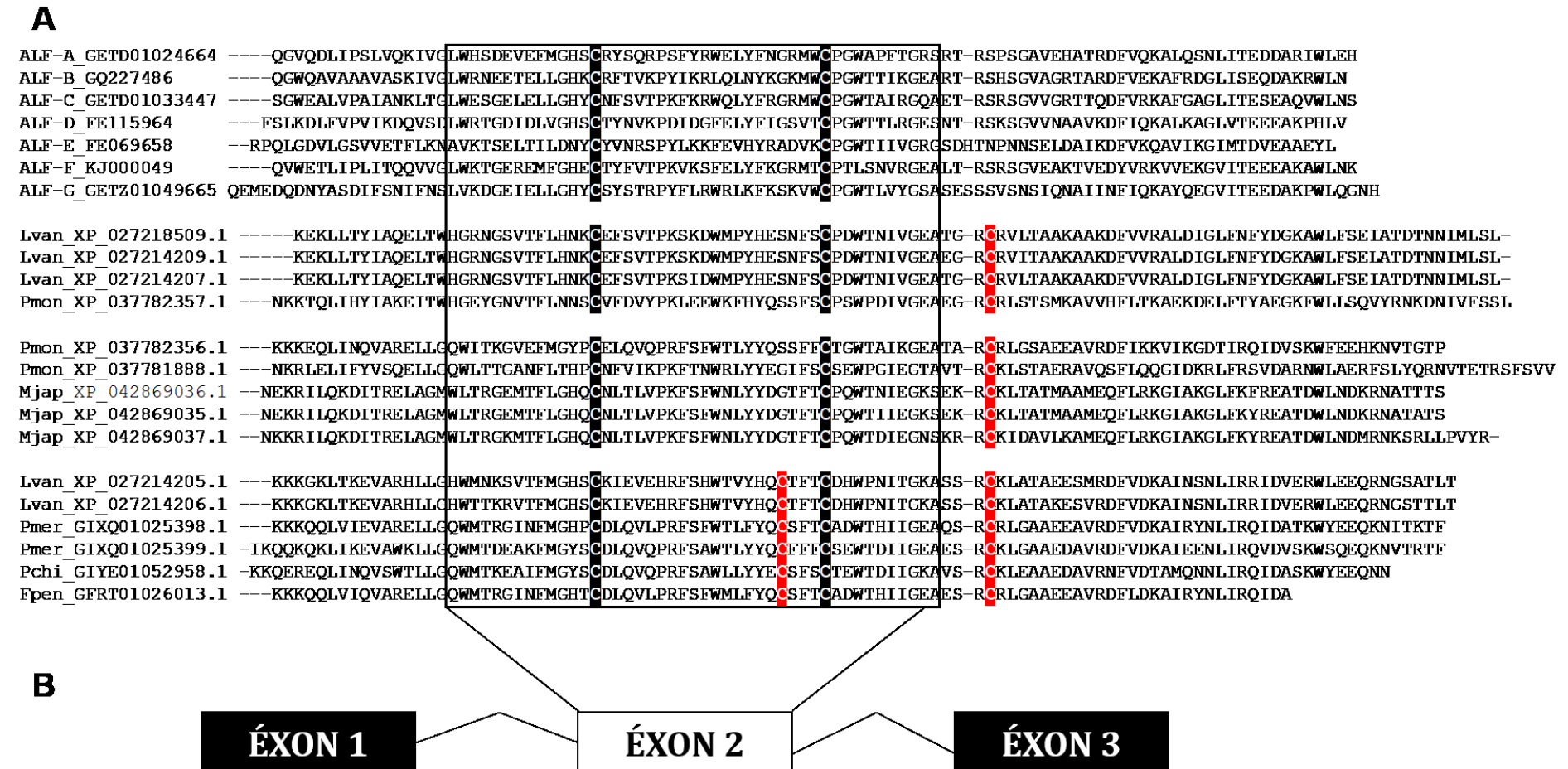
3. Resultados

3.1. Diversidade molecular de *ALFs-like*

Além de sequências correspondentes a ALFs (Capítulo II, Seção A), buscas por sequências similares resultaram na identificação de sequências relacionadas a ALFs (*ALFs-like*) apresentando três ou quatro resíduos de cisteínas, que foram aqui denominados ALFs-3cys e ALFs-4cys, respectivamente. O alinhamento entre ALFs e *ALFs-like* está disponível na Figura 1A, onde os resíduos de cisteína estão destacados. As buscas em bancos de dados anotados e não anotados resultaram na identificação de 15 sequências de *ALFs-like* encontradas exclusivamente em seis espécies distintas de camarões peneídeos: *L. vannamei* (n=5), *P. monodon* (n=3), *M. japonicus* (n=3), *Penaeus merguensis* (n=2), *Fenneropenaeus chinensis* (n=1) e *Fenneropenaeus penicillatus* (n=1), (Quadro 2, Figura 1A).

Em *L. vannamei*, foram identificados dois genes de ALFs-4cys codificando para um peptídeo maduro catiônico de 107 resíduos aminoacídicos, com massa molecular de 12,5 kDa e três genes de ALFs-3cys codificando para um peptídeo maduro aniônico de 109 resíduos aminoacídicos, com massa molecular de 12,3 kDa (Quadro 2). Em *P. monodon*, foram encontrados três genes de ALFs-3cys codificando para um peptídeo maduro de 106 a 116 resíduos aminoacídicos, com massa molecular de 13,0 kDa (Quadro 2). Em *M. japonicus*, foram encontrados três genes de ALF-3cys codificando para um peptídeo maduro catiônico de 107 a 111 resíduos aminoacídicos, com massa molecular de 12,4 a 13,23 kDa (Quadro 2). Em *P. merguensis* foram recuperados dois transcritos completos de ALF-4cys codificando para um peptídeo maduro catiônico de 106 (12,5 kDa) e para um peptídeo maduro aniônico de 108 resíduos aminoacídicos (12,7 kDa) (Quadro 2). Por fim, foram recuperados dois transcritos de ALF-4cys incompletos, um na espécie *F. penicillatus*, codificando para um peptídeo maduro catiônico de 92 resíduos aminoacídicos (10,7 kDa) e outro na espécie *F. chinensis*, codificando para um peptídeo maduro aniônico de 103 resíduos aminoacídicos (12,1 kDa) (Quadro 2).

A estrutura dos genes codificantes para esses peptídeos foi analisada nas espécies com genomas disponíveis em banco de dados (*L. vannamei*, *P. monodon* e *M. japonicus*) e comparadas com os genes de ALFs. Assim como descrito para os ALFs (Capítulo II, Seção A), os genes codificantes para *ALFs-like* são compostos por três éxons e dois íntrons de tamanhos variados (Figura 1B). Em todos os genes (ALFs, ALFs-3cys e ALFs-4cys), o segundo éxon codifica a porção central do peptídeo maduro, os dois resíduos de cisteína conservados em todas as sequências e um dos resíduos extra de cisteína encontrado em ALFs-4cys (Figura 1). O primeiro éxon codifica a região 5'-UTR, o peptídeo sinal e a porção N-terminal do peptídeo maduro, enquanto o terceiro éxon codifica a porção C-terminal do peptídeo maduro, contendo o terceiro resíduo de cisteína em ALFs-3cys e o quarto resíduo de cisteína em ALFs-4cys (Figura 1), assim como a região 3'-UTR.

Figura 1 - Alinhamento entre ALFs e *ALFs-like*

A. Alinhamento de *ALFs-like* encontrados em camarões penéideos e de seqüências representativas dos sete grupos de ALFs (Grupos A-G) em *L. vannamei*. Em preto estão os resíduos de cisteína conservados em todas as seqüências e em vermelho os resíduos de cisteína encontrados em *ALFs-like* que não estão presentes em ALFs. O quadrado delimita os resíduos aminoacídicos codificados pelo éxon 2. **Lvan**: *Litopenaeus vannamei*. **Pmon**: *Penaeus monodon*. **Mjap**: *Marsupenaeus japonicus*. **Pmer**: *Penaeus merguensis*. **Pchi**: *Fenneropenaeus chinensis*. **Fpen**: *Fenneropenaeus penicillatus*. B. Estrutura gênica de ALFs e peptídeos relacionados a ALFs composta por 3 éxons e 2 íntrons.

Quadro 2 - Caracterização molecular dos *ALFs-like* de peneídeos.

Espécie	LOCI	identificador	n° aa	MM (Da)	pI	n° cisteínas
<i>L. vannamei</i>	LOC113807189	XP_027214205.1	107	12500,30	9,39	4
	LOC113807190	XP_027214206.1	107	12523,35	9,78	4
	LOC113811032	XP_027218509.1	109	12393,13	7,00	3
	LOC113807192	XP_027214209.1	109	12421,14	6,32	3
	LOC113807191	XP_027214207.1	109	12378,12	6,31	3
<i>P. monodon</i>	LOC119578796	XP_037782356.1	106	12295,15	9,08	3
	LOC119578797	XP_037782357.1	112	13136,93	7,07	3
	LOC119578362	XP_037781888.1	116	13576,53	9,41	3
<i>M. japonicus</i>	LOC122251296	XP_042869036.1	107	12490,42	9,47	3
	LOC122251295	XP_042869035.1	107	12475,45	9,44	3
	LOC122251297	XP_042869037.1	111	13224,51	10,02	3
<i>P. merguensis</i>	-	GIXQ01025398.1	106	12548,49	8,77	4
	-	GIXQ01025399.1	108	12770,59	5,49	4
<i>F. penicillatus</i>	-	GFRT01026013.1	92	10798,56	8,48	4
<i>F. chinensis</i>	-	GIYE01052958.1	103	12153,76	4,90	4

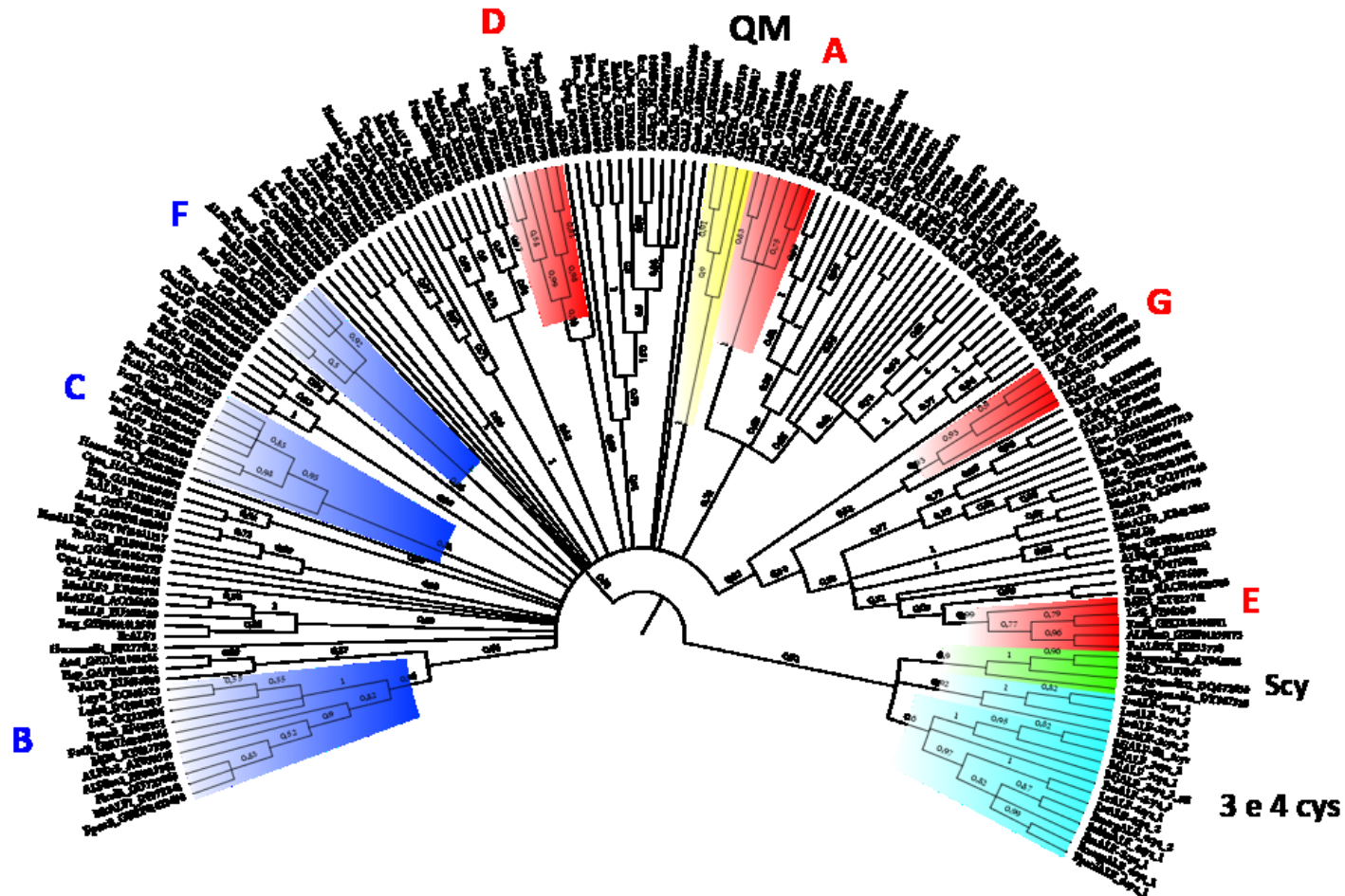
aa: resíduos aminoácidos; MM: massa molecular predita; pI: ponto isoelétrico teórico

A fim de compreender a relação filogenética entre esses peptídeos e os ALFs, foi realizada uma reconstrução filogenética de ALFs de crustáceos decápodes (capítulo II, Seção A), ALFs de quelicerados marinhos, ALFs-3cys, ALFs-4cys e scygonadinas (Figura 2). As sequências foram agrupadas em dois grandes clados, um referente aos ALFs autênticos (ALFs de crustáceos decápodes e ALFs de quelicerados marinhos) e outro referente aos peptídeos relacionados a ALFs (scygonadinas, ALFs-3cys e ALFs-4cys) (Figura 2). No clado dos ALFs é possível visualizar os ALFs de quelicerados marinhos, os sete grupos de ALFs de camarões peneídeos (Grupos A a G) e outros ALFs de crustáceos decápodes (Figura 2). No clado referente aos peptídeos relacionados a ALFs, as sequências foram agrupadas em pelo menos três grupos distintos: um primeiro grupo referente às scygonadinas, um segundo grupo com ALFs-3cys de *L. vannamei* e a sequência XP_037782357.1 de *P. monodon* e um terceiro grupo com ALFs-4cys e os peptídeos catiônicos com 3 cisteínas de *M. japonicus* e *P. monodon*. Todas as

sequências encontradas de ALFs-3cys e ALFs-4cys formaram um clado distinto de ALFs e relacionado a scygonadinas, confirmando que esses peptídeos com três ou quatro cisteínas não são ALFs autênticos, mas sim compõem um grupo a parte, aqui denominados *ALFs-like*.

Os resultados da análise filogenética (Figura 2) em conjunto com as características bioquímicas de cada peptídeo (Quadro 2) indicam que pelo menos dois grupos distintos de *ALFs-like* são encontrados em *L. vannamei*: os peptídeos com três cisteínas (ALFs-3cys) de caráter aniônico e os peptídeos com quatro cisteínas (ALFs-4cys) de caráter catiônico. Com base nesses resultados, essas duas sequências foram escolhidas para as análises de expressão gênica subsequentes, avaliando a divergência funcional desses peptídeos e comparando-as com os ALFs (Capítulo II, Seção A).

Figura 2 – Reconstrução filogenética de ALFs e peptídeos relacionados a ALFs.

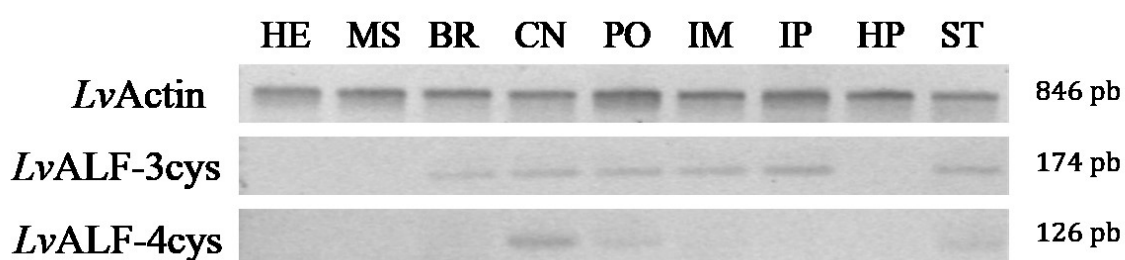


Árvore filogenética de ALFs e peptídeos relacionados a ALFs, reconstruída pelo método de *Maximum likelihood*. Os Grupos de ALFs autênticos de camarões peneídeos (Grupos A a G) estão representados em azul (catiônicos) e vermelho (aniônicos). Os ALFs de quelicerados marinhos (QM) estão representados em amarelo. As scygonadinas (Scy) estão representadas em verde e ALFs-3cys e ALFs-4cys estão representados em azul ciano.

3.2. Expressão gênica de *ALFs-like*

A fim de verificar os diferentes tecidos envolvidos na expressão desses peptídeos, a distribuição da expressão gênica foi verificada por RT-PCR em nove diferentes tecidos/órgãos de camarões *L. vannamei* (hemócitos, músculo, brânquias, cordão nervoso, pedúnculo ocular, intestino médio, intestino posterior, hepatopâncreas e estômago). O perfil de expressão se mostrou diverso nos tecidos analisados (Figura 3), porém os transcritos de *ALFs-like* não se mostraram expressos em hemócitos circulantes, como ocorre com os ALFs autênticos (Capítulo II, Seção A). Transcritos de ALF-3cys foram detectados nas brânquias, cordão nervoso, pedúnculo ocular, intestino médio, intestino posterior e estômago (Figura 3). Transcritos de ALF-4cys foram detectados no cordão nervoso, pedúnculo ocular e estômago e uma banda com menor intensidade foi observada no intestino médio (Figura 3). Em todos os tecidos analisados, a amplificação de transcritos de β -actina mostrou-se estável (Figura 3), confirmando a integridade dos cDNAs utilizados.

Figura 3 - Distribuição da expressão gênica de ALF-3cys e ALF-4cys em *Litopenaeus vannamei*

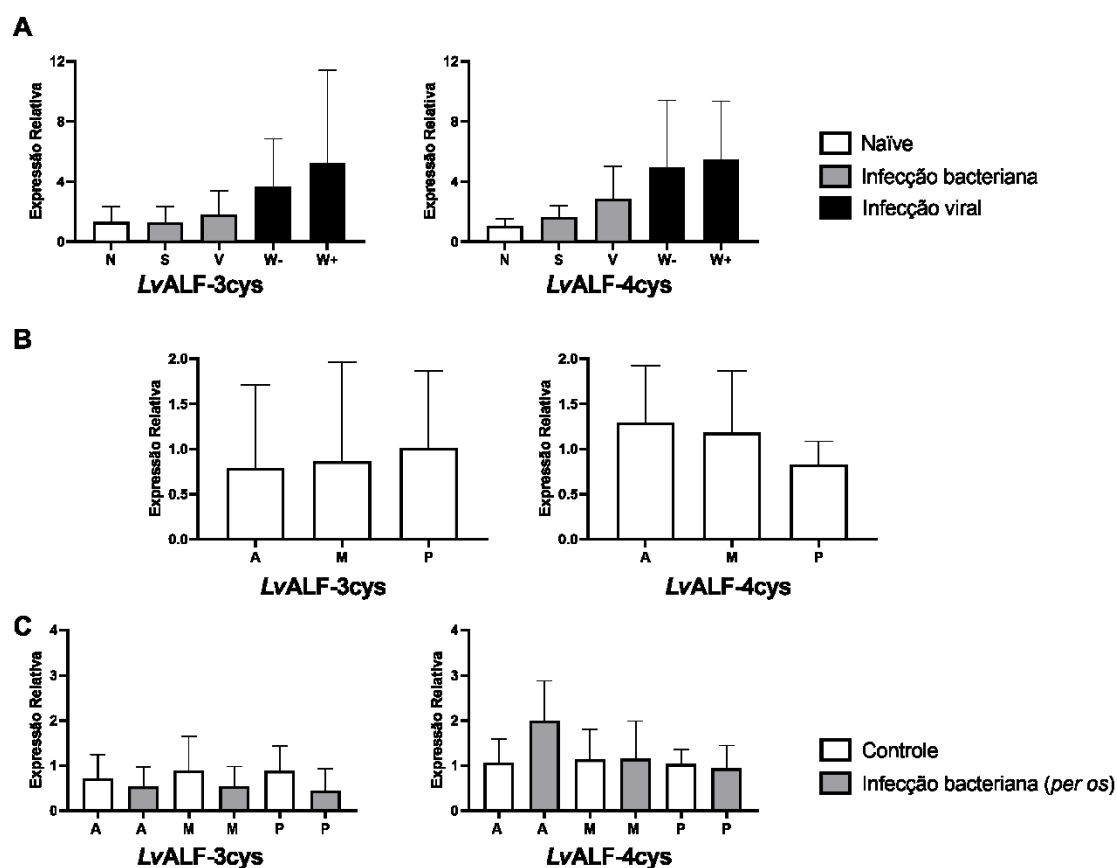


Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação de transcritos de peptídeos relacionados a ALFs e β -actina (*LvActin* - controle). **pb**: pares de base. **HE**: hemócitos. **MS**: músculo. **BR**: brânquias. **CN**: cordão nervoso. **PO**: pedúnculo ocular. **IM**: intestino médio. **IP**: intestino posterior. **HP**: hepatopâncreas. **ST**: estômago

Em seguida, os níveis transcricionais dessas novas sequências foram quantificados em hemócitos e intestino médio de animais desafiados com a bactéria Gram-negativa *V. harveyi* ATCC 14126 ou com o WSSV. Optou-se por avaliar a expressão em hemócitos a fim de confirmar a ausência de expressão nesse tecido e em intestino médio que representa o tecido diretamente associado à uma das principais vias de entrada de microrganismos nas infecções *in vivo*. Confirmando os resultados de RT-PCR, a expressão relativa de *ALFs-like* não foi observada em hemócitos de animais controle ou infectados via sistêmica pelos dois patógenos. No intestino médio, foi possível quantificar a expressão de ambos os genes em todos os grupos, no entanto não houve modulação da expressão frente às infecções experimentais (Figura 4A).

A fim de confirmar que esses peptídeos não são modulados no intestino médio frente a infecções bacterianas, optou-se por realizar um segundo experimento de infecção, mais similar ao processo natural de infecção. Para isso os animais foram desafiados *per os* com a bactéria *V. harveyi* ATCC 14126 e o nível de expressão desses peptídeos foi quantificado em diferentes porções do intestino médio de camarões saudios ou infectados. Como resultado, não foi encontrada diferença na expressão de ALF-3cys e ALF-4cys entre as três porções do intestino médio (Figura 4B), nem mesmo modulação em nenhuma porção após a infecção bacteriana (Figura 4C).

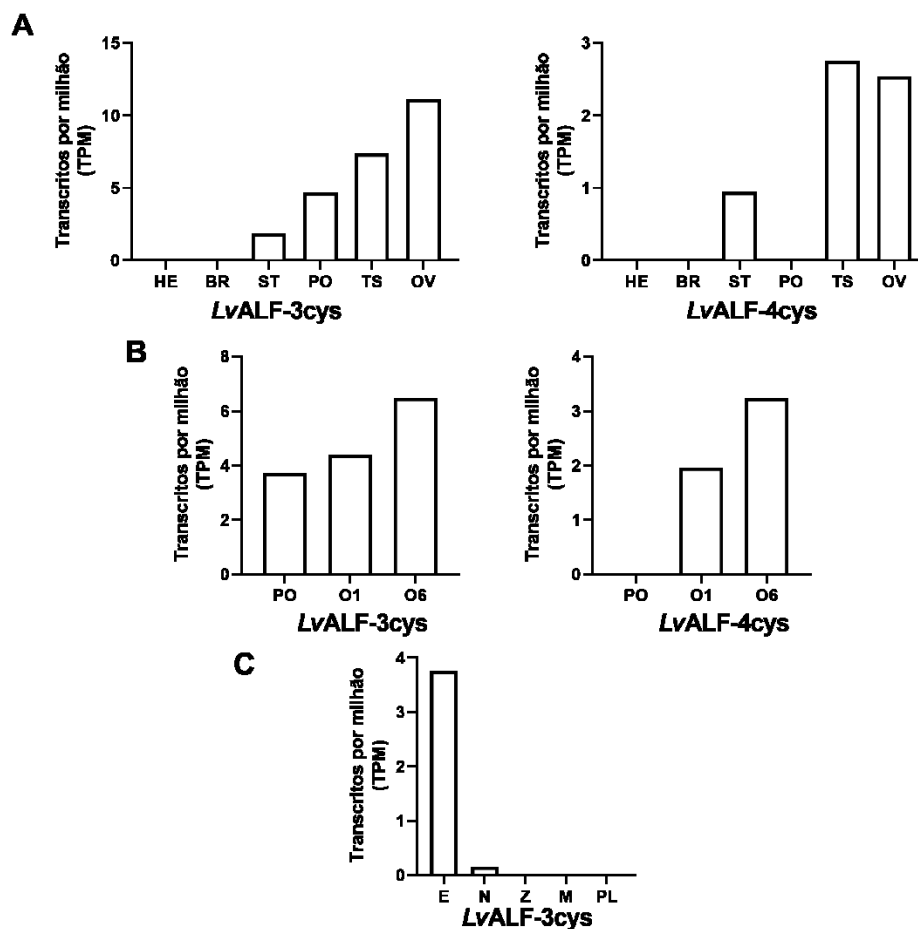
Figura 4 – Níveis de transcritos de ALF-3cys e ALF-4cys no intestino médio de *L. vannamei*



A. Gráficos de expressão relativa de *ALFs-like* em intestino médio frente infecções experimentais. **N:** animais *naïve*. **S:** animais controle injetados com salina. **V:** animais infectados com *V. harveyi* ATCC 14126. **W-:** animais controle que receberam inóculo livre de vírus. **W+:** animais desafiados com WSSV. Em branco estão representados os animais do grupo *naïve*, em cinza os animais da infecção experimental bacteriana e em preto da infecção experimental viral. **B.** Gráficos de expressão relativa de *ALFs-like* em três porções distintas de intestino médio de animais controle (não desafiados): (A) anterior; (M) medial, (P) posterior. **C.** Gráficos de expressão relativa de *ALFs-like* em três porções distintas de intestino médio de animais controle (em branco) e desafiados *per os* com a bactéria *V. harveyi* ATCC 14126 (em cinza). (A) anterior; (M) medial, (P) posterior. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de triplicatas biológicas.

Devido às semelhanças com as scygonadinas, que são expressas majoritariamente nas gônadas do caranguejo *S. serrata*, os níveis de transcritos de ALF-3cys e ALF-4cys foram avaliados, por análises *in silico*, nas gônadas de camarões adultos e ao longo do desenvolvimento embrionário de *L. vannamei*. Os níveis de transcritos de ALF-3cys e ALF-4cys foram quantificados em diferentes bibliotecas transcritômicas disponíveis em bancos de dados públicos. Inicialmente, os níveis de transcritos em bibliotecas de gônadas maduras (ovários e testículos) foram comparados com os níveis de transcritos em bibliotecas de outros quatro tecidos (hemócitos, brânquias, estômago e pedúnculo ocular). Os transcritos de ALF-3cys e ALF-4cys foram identificados em maior abundância nas bibliotecas de gônadas maduras (testículos e ovários) e em menor escala em bibliotecas de pedúnculo ocular e estômago (Figura 5A). Em seguida, os níveis de transcritos de ALF-3cys e ALF-4cys foram quantificados ao longo da maturação do ovário de *L. vannamei*. Para isso, os níveis de ALF-3cys e ALF-4cys foram quantificados em bibliotecas de ovários de camarões fêmeas em diferentes estágios de maturação gonadal, decorrente do processo de ablação do pedúnculo ocular visando induzir à maturação ovariana (PENG *et al.*, 2015). Três bibliotecas de ovários foram avaliadas em fêmeas nas fases de: (i) pré-ablação; (ii), um dia após a ablação e, (iii) seis dias após a ablação. Transcritos de ALF-4cys não foram identificados em ovários de fêmeas não ablatadas (pré-ablação do pedúnculo ocular), mas tiveram um aumento dos níveis de transcritos após a ablação (1 e 6 dias após a retirada do pedúnculo ocular), revelando que a expressão deste transcrito é induzida durante a maturação ovariana (Figura 5B). Transcritos de ALF-3cys foram identificados nas três bibliotecas analisadas, e assim como observado com o ALF-4cys, tiveram um aumento dos níveis de transcritos em ovários de fêmeas ablatadas (maturação ovariana) (Figura 5B). Por fim os níveis de transcritos de ALFs-3cys e ALFs-4cys foram quantificados em bibliotecas de cinco estágios do desenvolvimento de *L. vannamei*: embriões, náuplios, zoea, mísis e pós-larvas. Transcritos de ALF-3cys foram encontrados em embriões e praticamente ausentes em náuplios, enquanto transcritos de ALF-4Cys não foram quantificáveis em nenhum dos estágios analisados (Figura 5C).

Figura 5 – Níveis de transcritos de ALFs-3cys e ALFs-4cys em diferentes tecidos de *L. vannamei* e ao longo do seu desenvolvimento embrionário.



A. Níveis de transcritos de ALF-3cys e ALF-4cys em bibliotecas transcritômicas de seis tecidos distintos. **HE:** hemócitos; **BR:** brânquias; **ST:** estômago; **PO:** pedúnculo ocular; **TS:** testículos; **OV:** ovários. **B.** Níveis de transcritos de ALF-3cys e ALF-4cys em bibliotecas de ovários de fêmeas em diferentes estágios da maturação gonadal. **PO:** pré-ablação do pedúnculo ocular; **O1:** 1 dia após ablação do pedúnculo ocular; **O6:** 6 dias após ablação do pedúnculo ocular. **C.** Níveis de transcritos de ALF-3cys em bibliotecas ao longo do desenvolvimento embrionário (transcritos de ALF-4cys não foram quantificáveis nessas bibliotecas) **E:** embrião; **N:** náuplio; **Z:** zoeae; **M:** mísis; **PL:** pós-larva. Os níveis de transcritos em todos os gráficos estão representados em transcritos por milhão (TPM).

4. Discussão

Neste trabalho foram identificados e caracterizados em nível molecular e transcricional peptídeos relacionados a ALFs contendo três ou quatro resíduos de cisteínas. Esses peptídeos foram aqui denominados *ALFs-like* e divididos em dois grupos ALFs-3cys e ALFs-4cys de acordo com o número de resíduos de cisteína presente. Análises filogenéticas entre esses peptídeos, scygonadinas e ALFs de crustáceos e quelicerados marinhos confirmaram que *ALFs-like* não são ALFs autênticos, mas compõem um grupo irmão relacionado às scygonadinas. Esses resultados, em conjunto com a estrutura gênica conservada desses peptídeos, sugerem

que os ALFs, *ALFs-like* e as scygonadinas derivaram de um gene ancestral comum. Até o momento, *ALFs-like* foram encontrados exclusivamente em camarões peneídeos (Subordem Dendrobranchiata), enquanto scygonadinas foram encontradas exclusivamente em caranguejos do gênero *Scylla* (Subordem Pleocyemata) (HUANG *et al.*, 2006). Levando em consideração a distância evolutiva entre esses grupos taxonômicos, esses resultados sugerem que eventos de duplicação ocorreram exclusivamente nesses táxons e não em um ancestral comum de crustáceos. Dessa maneira, um gene ancestral deu origem aos ALFs e às scygonadinas em caranguejos do gênero *Scylla* e aos ALFs e aos *ALFs-like* em camarões peneídeos. No entanto, novos estudos são necessários a fim de avaliar a diversidade dessas moléculas em outros táxons de crustáceos e confirmar a história evolutiva desses peptídeos.

Os resultados de análise da expressão gênica de ALFs, scygonadinas e *ALFs-like* demonstram que enquanto os ALFs são expressos simultaneamente nos hemócitos (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2013), *ALFs-like* e scygonadinas (WANG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2011) são expressos majoritariamente nas gônadas e não são expressos em hemócitos circulantes. AMPs expressos exclusivamente nas gônadas têm sido descritos em diferentes espécies de artrópodes e moluscos, indicando uma relação entre o sexo dos animais e a expressão de AMPs específicos (SAMAKOVLIS *et al.*, 1991; MARCHINI *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2012; QIN *et al.*, 2014; JACOBS *et al.*, 2016). Por exemplo, andropinas são AMPs encontrados exclusivamente no ducto ejaculatório de *Drosophila melanogaster* (SAMAKOVLIS *et al.*, 1991), enquanto Ceratotoxinas A tem expressão restrita às glândulas acessórias de fêmeas de *Ceratitis capitata* (MARCHINI *et al.*, 1993). Ademais, alguns AMPs são encontrados em ambos os sexos, mas com expressão majoritária em um tipo de gônada, como as crustinas do Tipo I em caranguejos (SULEIMAN *et al.*, 2017), lisozimas e thaumatinas em besouros (JACOBS *et al.*, 2016) e mytichitinas-CB, myticusinas e mythilinas em mexilhões (QIN *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2022). Esses estudos apontam a importância de AMPs na proteção contra infecções nas gônadas, mas também para a manutenção da microbiota no trato reprodutivo e proteção contra patógenos no ambiente de ovoposição (XU *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2012; JACOBS *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2022). Dessa maneira, é possível hipotetizar que enquanto os ALFs representam um importante grupo de efetores imunológicos da imunidade sistêmica, scygonadinas e *ALFs-like* atuam na proteção de epitélios específicos como os das gônadas desses animais.

É proposto que a diversidade de sequências de AMPs encontrada em um grupo taxonômico seja resultado da seleção de diferentes moléculas ampliando o seu espectro de

atividade antimicrobiana ou adquirindo novas funções biológicas (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). Ensaios de atividade *in vitro* de scygonadinas e de ALF-3cys em *M. japonicus* demonstraram que esses peptídeos apresentam baixa atividade antimicrobiana, sendo ativos principalmente contra bactérias Gram-positivas (HUANG *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2015). Além de AMPs convencionais, peptídeos cuja função principal está associada a outros processos biológicos, mas que apresentam atividade antimicrobiana têm sido amplamente identificados em crustáceos (KULKARNI *et al.*, 2021). Curiosamente, enquanto ALFs são induzidos frente injúrias e infecções microbianas (PONPRATEEP *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2014, Capítulo II, Seção A), scygonadinas e *ALFs-like* têm sua expressão induzida durante a maturação das gônadas e não frente a estímulos microbianos (XU *et al.*, 2011; QIAO *et al.*, 2016). Esse mesmo perfil de expressão é observado em outros AMPs de expressão exclusiva em gônadas (SAMAKOVLIS *et al.*, 1991; ZHENG *et al.*, 2012; QIN *et al.*, 2014). Além da defesa contra infecções no trato reprodutivo desses animais, é possível que esses peptídeos apresentem outras funções biológicas, contribuindo para a maturação sexual desses animais.

Em conclusão, neste trabalho foram caracterizadas sequências de *ALFs-like* que são encontradas exclusivamente em camarões peneídeos e que são expressas majoritariamente nas gônadas. Este trabalho aponta a possível divergência funcional de moléculas relacionadas a ALFs, no entanto novos estudos são necessários a fim de confirmar a função desses peptídeos em camarões peneídeos e compreender a história evolutiva de ALFs e *ALFs-like* em crustáceos.

Referências

- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- DINESH YEDERY, R.; VENKATA RAMI REDDY, K. **Purification and characterization of antibacterial proteins from granular hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata***. 2009.
- DOBIN, A.; DAVIS, C. A.; SCHLESINGER, F.; et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.
- GONCALVES, P.; GUERTLER, C.; BACHÈRE, E.; et al. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, 2014.
- HUANG, W. S.; WANG, K. J.; YANG, M.; et al. Purification and part characterization of a novel antibacterial protein Scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata* (Forskål, 1775). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 339, n. 1, p. 37–42, 2006.

JACOBS, C. G. C.; STEIGER, S.; HECKEL, D. G.; et al. Sex, offspring and carcass determine antimicrobial peptide expression in the burying beetle. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2016.

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

KULKARNI, A.; KRISHNAN, S.; ANAND, D.; et al. Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 431–459, 2021.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, 2011.

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

MARCHINI, D.; GIORDANO, P. C.; AMONS, R.; BERNINI, L. F.; DALLAI, R. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (insecta:Diptera). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 23, n. 5, p. 591–598, 1993.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. a006049, 2012.

PENG, J.; WEI, P.; ZHANG, B.; et al. Gonadal transcriptomic analysis and differentially expressed genes in the testis and ovary of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **BMC genomics**, v. 16, n. 1, 2015.

PILOTTO, M. R.; GONÇALVES, A.N.A.; VIEIRA, F. N. 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, 2018.

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

QIAO, K.; XU, W. F.; CHEN, H. Y.; et al. A new antimicrobial peptide SCY2 identified in *Scylla Paramamosain* exerting a potential role of reproductive immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 51, p. 251–262, 2016.

QIN, C. L.; HUANG, W.; ZHOU, S. Q.; et al. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 362–370, 2014.

REN, Q.; ZHANG, Z.; LI, X.; et al. Three different anti-lipopolysaccharide factors identified from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 766–774, 2012.

ROSA, R. D.; VERGNES, A.; DE LORGERIL, J.; 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, 2013.

SAMAKOVLIS, C.; KYLSTEN, P.; KIMBRELL, D. A.; ENGSTROM, A.; HULTMARK, D. The Andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. **EMBO Journal**, v. 10, n. 1, p. 163–169, 1991.

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

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

SOMBOONWIWAT, K.; BACHÈRE, E.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. 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.

SULEIMAN, S.; SMITH, V. J.; DYRYNDA, E. A. Unusual tissue distribution of carcinin, an antibacterial crustin, in the crab, *Carcinus maenas*, reveals its multi-functionality. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 76, p. 274–284, 2017.

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

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

WANG, K. J.; HUANG, W. S.; YANG, M.; et al. A male-specific expression gene, encodes a novel anionic antimicrobial peptide, scygonadin, in *Scylla serrata*. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 8, p. 1961–1968, 2007.

XU, W. F.; QIAO, K.; HUANG, S. P.; et al. The expression pattern of scygonadin during the ontogenesis of *Scylla paramamosain* predicting its potential role in reproductive immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 10, p. 1078–1090, 2011.

YANG, J.; HE, J.; LIU, L.; et al. Expression profiles of antimicrobial peptides in *Mytilus coruscus*. **Aquaculture**, v. 548, p. 737709, 2022.

ZHENG, H.; ZHOU, L.; YANG, X.; WANG, D.; LIU, J. Cloning and characterization of a male-specific defensin-like antimicrobial peptide from the tick *Haemaphysalis longicornis*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 37, n. 1, p. 207–211, 2012.

5. CAPÍTULO III: Potencial biotecnológico de peptídeos derivados de ALFs

Este capítulo apresentará e discutirá os resultados referentes às análises para avaliação do potencial biotecnológico de peptídeos derivados da região entre cisteínas de novos ALFs identificados no Capítulo II. Peptídeos sintéticos sem cisteína apresentam estrutura secundária distinta do encontrado na molécula nativa e formam poros em membranas bacterianas. Os peptídeos sintéticos demonstraram amplo espectro de atividade contra bactérias de interesse veterinário e aquícola em baixas concentrações sem apresentar citotoxicidade a células de mamíferos, reforçando o seu potencial como agente antimicrobiano.

1. Introdução

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) de crustáceos representam importantes moléculas bioativas com potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (LEWIES *et al.*, 2019). Os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) são peptídeos com alta afinidade a componentes microbianos e apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). O peptídeo maduro dos ALFs apresenta dois resíduos conservados de cisteína, cuja ligação dissulfeto determina uma região em formato de grampo de folhas- β (β -*hairpin*), que é responsável pela atividade biológica da molécula (HOESS *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 2009). Estudos com peptídeos derivados da região em β -*hairpin* demonstraram que substituições de resíduos não carregados, por resíduos catiônicos levaram a um aumento na atividade antimicrobiana desses peptídeos (GUO *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2016). Esses resultados indicam que modificações na estrutura aminoacídica primária de peptídeos derivados de ALFs representam uma alternativa para produção de moléculas bioativas com diferentes espectros de atividade antimicrobiana. Dentro desse contexto, o objetivo deste capítulo foi avaliar o potencial biotecnológico de peptídeos derivados de novos ALFs identificados e caracterizados no Capítulo II. Para isso, peptídeos derivados da região entre cisteína de ALFs foram sintetizados quimicamente. A fim de avaliar o potencial uso desses peptídeos como novos antimicrobianos avaliou-se o seu espectro de atividade antimicrobiana (individualmente e em sinergia), a capacidade de formação de poros em membranas bacterianas, assim como o seu efeito citotóxico em células de mamíferos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Síntese química de peptídeos e dicróismo circular

Peptídeos derivados da região entre cisteínas dos novos ALFs identificados em *L. vannamei* (*Litvan* ALF-E, *Litvan* ALF-F e *Litvan* ALF-G, Capítulo II, Seção A) foram sintetizados quimicamente em parceria com a Dra. Paulina Schmitt do *Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular da Pontificia Universidad Católica de Valparaíso* (Valparaíso, Chile) (Quadro 1).

Quadro 1 – Sequência aminoacídica, massa molecular (MM) e ponto isoeletrico teórico (pI) dos peptídeos sintéticos.

Peptídeo	Sequência aminoacídica	MM (Da)	pI
<i>Litvan</i> ALF-E ₃₃₋₅₂	YVNRSPYLKKFEVHYRADVK	2512,90	9,70
<i>Litvan</i> ALF-F ₃₁₋₅₀	TYFVTPKVKSFELYFKGRMT	2442,90	9,82
<i>Litvan</i> ALF-G ₃₅₋₅₄	SYSTRPYFLRWRLKFKSKVW	2649,14	11,12

Os peptídeos foram sintetizados no equipamento Liberty Blue *automated microwave peptide synthesizer* (CEM Corporation) a partir de aminoácidos com grupamentos 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) (Iris Biotech GmbH) em resina Rink Amide AM 0.6 meq/g (Chem-Inmpex). Os peptídeos sintéticos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com gradiente de acetonitrila (0 a 70%) em fluxo de 1 mL/min por 30 min. Por fim, os peptídeos foram liofilizados e analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) para confirmar a massa molecular (Quadro 1). Os peptídeos liofilizados foram suspensos em água ultrapura estéril na concentração estoque de 1 mM e estocados a - 20°C até o uso.

A fim de confirmar a sua estrutura secundária, os peptídeos sintetizados foram ressuspendidos em água ultrapura estéril acrescida de 30% de trifluoroetanol. O espectro de dicroísmo circular foi obtido a 20°C, 30°C e 37°C em comprimentos de onda de 190 a 260 nm, com cubeta de quartzo de 2 mm em espectrômetro J-810 (Jasco Corporation).

2.2. Testes antimicrobianos

2.2.1. Microrganismos

As cepas de cada microrganismo, o meio de cultura utilizado e a temperatura para crescimento estão apresentados no Quadro 2. Todos os microrganismos utilizados fazem parte do cepário do LIAA e permanecem estocados a -80°C em seus respectivos meios de cultura acrescidos de 15% de glicerol. As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram cultivadas em meio “*Lysogeny Broth*” (LB), as bactérias do gênero *Vibrio* foram cultivadas em meio LB-NaCl 3% e as bactérias marinhas *Microbacterium maritypicum* e *Brevibacterium stationis* foram cultivadas em meio Zobell. As culturas foram incubadas *overnight* em temperatura própria para crescimento sob agitação constante. Para isolamento de colônias, as culturas foram semeadas em meio de cultura sólido (meio próprio para crescimento acrescido de ágar 15 g/L) e incubadas

overnight em temperatura própria para crescimento (*M. maritypicum*, *B. stationis*, e bactérias do gênero *Vibrio* foram incubadas por 48 h).

Quadro 2 – Microrganismos e condições de cultivo.

Microrganismos	Meio de cultivo	Meio para teste	Temperatura
Bactérias Gram-positivas			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	LB	PB	37°C
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	LB	PB	37°C
<i>Micrococcus luteus</i> CIP 5345	LB	PB	30°C
<i>Microbacterium maritypicum</i> CIP 105733	Zobell	Zobell 1/3	30°C
<i>Brevibacterium stationis</i> CIP 101282	Zobell	Zobell 1/3	30°C
Bactérias Gram-negativas			
<i>Escherichia coli</i> SBS363	LB	PB	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	LB	PB	30°C
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	LB-NaCl 3%	PB NaCl 3%	20°C
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264	LB-NaCl 3%	PB-NaCl 3%	20°C
<i>Vibrio nigripulchritudo</i> CIP103195	LB-NaCl 3%	PB-NaCl 3%	28°C

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

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

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

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

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

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

2.2.2. Testes antibacterianos

A fim de avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos peptídeos sintetizados, foram realizados testes de concentração inibitória mínima (MIC), segundo protocolo adaptado de DESTOUMIEUX e colaboradores (1999). Uma única colônia isolada de cada bactéria foi cultivada em meio de cultura e temperatura próprias. Após crescimento, a cultura foi diluída 100 vezes em meio de cultura fresco e posta para crescer novamente até atingir uma densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) entre 0,1 e 0,2. Atingida essa DO, a suspensão microbiana foi diluída

100 vezes em meio com poucos nutrientes (PB, PB-NaCl 3% ou Zobell 1/3; Quadro 2) e então utilizada para o teste de MIC.

Os testes de MIC foram realizados em microplacas de 96 poços, contendo 90 µL da suspensão bacteriana diluída em meio com poucos nutrientes e 10 µL do peptídeo sintético em diferentes concentrações (40; 20; 10; 5; 2.5; 1,25; 0,6 e 0,3 µM). Os ensaios foram realizados em duplicatas, utilizando água ultrapura estéril (solução de suspensão dos peptídeos) como controle negativo da atividade. As placas foram incubadas em temperatura ótima de crescimento (Quadro 2) sob agitação leve por 24 h e a inibição do crescimento foi medida por espectrofotômetro a 595 nm. A concentração inibitória mínima foi determinada como o intervalo entre a concentração mínima de peptídeo capaz de inibir 100% do crescimento microbiano e a concentração máxima de peptídeo em que foi observado crescimento microbiano. A fim de avaliar o efeito bacteriostático ou bactericida do peptídeo, os poços em que foi observada a inibição do crescimento foram semeados em meio sólido rico em nutrientes. Nas placas em que foram observadas unidades formadoras de colônia, o efeito do peptídeo foi considerado como bacteriostático, enquanto que, nas placas em que não foram observadas colônias, o efeito foi considerado bactericida.

2.2.3 Testes de atividade antimicrobiana em sinergia

A atividade antimicrobiana em sinergia entre dois peptídeos sintéticos foi avaliada utilizando o teste de titulação modificado por SCHMITT *et al.*, (2012). Para avaliar a possível redução na concentração inibitória de cada peptídeo, diluições seriadas de um peptídeo foram combinadas com ½ MIC do outro peptídeo e vice-versa. Os resultados obtidos foram expressos pelo índice de Concentração Inibitória Fracionária (FIC). Valores de FIC foram calculados a partir da seguinte fórmula: $FIC = (A)/MIC_A + (B)/MIC_B$, onde MIC_A e MIC_B são os MICs dos peptídeos A e B testados individualmente e (A) e (B) são os MICs dos peptídeos testados em conjunto. Os valores de FIC são interpretados da seguinte maneira: $FIC \leq 0.5$, forte efeito sinérgico; 0.5-1 com efeito sinérgico; ≥ 1 efeito aditivo; =2 sem efeito sinérgico; ≥ 2 efeito antagonista (SCHMITT *et al.*, 2012). Para os testes de sinergia foram testadas combinações de *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂, *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ contra a bactéria Gram-positiva marinha *M. maritypicum* e combinações de *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ contra as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *V. nigrripulchritudo*. As bactérias foram cultivadas e incubadas com os peptídeos conforme descrito nas seções 2.2.1 e 2.2.2, respectivamente.

2.3. Ensaios de permeabilidade de membrana

A capacidade de formação de poros em membrana bacteriana foi avaliada a partir do monitoramento da hidrólise do substrato orto-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG) pela β -galactosidase citoplasmática de *E. coli* ML35 conforme descrito por GONZALEZ e colaboradores (2007). Os ensaios foram realizados em parceria com o *Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular da Pontificia Universidad Católica de Valparaíso* (Valparaíso, Chile). Brevemente, uma colônia isolada de *E. coli* ML35 foi cultivada em meio LB a 37°C *overnight*. Após crescimento, a cultura foi diluída 100 vezes em meio de cultura fresco e posta para crescer novamente até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. Atingida essa DO, a suspensão microbiana foi precipitada e ressuspendida em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7.4 na concentração de aproximadamente 5×10^7 CFU/mL. A suspensão bacteriana foi distribuída em placas de 96 poços contendo 2,5 mM de ONPG. Como controle positivo, as células foram incubadas com o detergente Triton X-10 numa concentração final de 0.05% e como controle negativo as células foram incubadas com água ultrapura estéril (solução diluente dos peptídeos). As placas foram incubadas a 37°C e a absorbância a 405 nm foi medida a cada 5 min por 2 h utilizando uma leitora de microplacas Multiscan EX (Labsystems).

2.4. Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em parceria com o Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina (LVA-UFSC). Para avaliar o efeito citotóxico em células de mamíferos, foram utilizadas duas linhagens celulares distintas: células VERO (ATCC:CCL 81) de rim de macaco *Chlorocebus aethiops* e células da linhagem A549 de carcinoma de pulmão humano (*non-small cell lung cancer cells* - NSCLC, A549, ATCC: CCL185). Ambas as linhagens foram cultivadas em meio MEM (*Minimal Essential Medium*, Gibco) suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino e mantidas a 37°C em atmosfera umedecida com 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada a partir do ensaio colorimétrico quantitativo utilizando sulforrodamina B (SRB - Sigma Aldrich) conforme descrito por VICHAI e colaboradores (2006) e padronizado por SILVA (2009). Brevemente, as linhagens celulares foram semeadas (1×10^4 /poço em placas de 96 poços) e após 24 h foram expostas a diferentes concentrações de peptídeos sintéticos (10; 5; 2,5; 1,25; 0,6; 0,3; 0,15; 0,07 e 0,03 μ M) por 48 h. Depois do período de incubação, as células foram fixadas com 10% de ácido tricloroacético e em seguida as células viáveis foram coradas com solução ácida de sulforrodamina B (0,057% p/v) por 30 min à temperatura ambiente e a absorbância em cada

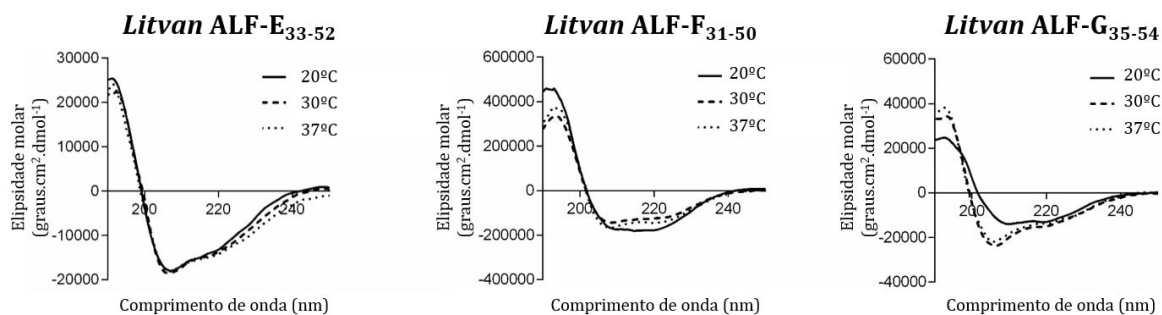
poço foi medida a 510 nm. Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada amostra testada foram transformados em porcentagens de viabilidade, em relação aos controles celulares (considerados 100% viáveis). Os ensaios foram realizados em duplicatas, utilizando água ultrapura estéril como controle negativo da atividade. A porcentagem de células viáveis foi plotada no GraphPad (Prism) para cada concentração testada.

3. Resultados

3.1. Estrutura secundária dos peptídeos derivados de ALFs

Peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas de novos ALFs identificados em *L. vannamei* (*Litvan ALF-E₃₃₋₅₂*, *Litvan ALF-F₃₁₋₅₀* e *Litvan ALF-G₃₅₋₅₄*) foram sintetizados quimicamente para avaliar o seu potencial biotecnológico como novos antimicrobianos. Optou-se por não adicionar os resíduos de cisteína a fim de aumentar a anfipacidade dos peptídeos sintetizados. Os peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteína tiveram sua estrutura secundária analisada por dicroísmo circular e todos apresentaram picos negativos em aproximadamente 208 e 222 nm e um pico positivo em aproximadamente 190 nm, semelhante ao esperado para estruturas majoritariamente em α -hélice (Figura 1). Os espectros se mativeram semelhantes nas três temperaturas avaliadas 20°C, 30°C e 37°C (Figura 1), indicando que a temperatura de cultivo dos microrganismos não altera a estrutura dos peptídeos. Essa estrutura é diferente do observado na molécula nativa, onde as cisteínas delimitam uma estrutura em grampo de folhas- β (HOESS *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 2009).

Figura 1 - Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos derivados de ALFs



Espectros de dicroísmo circular obtidos a 20°C (linha contínua), 30°C (traço e ponto) e 37°C (pontos).

3.2. Espectro de atividade antibacteriana de peptídeos derivados de ALFs

O espectro de atividade antimicrobiana dos peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas (*Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂, *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄) foi comparado ao espectro de peptídeos sintetizados em β -*hairpin* (Capítulo II, Seção A). A comparação entre os valores de MIC de cada peptídeo está apresentado no Quadro 3. De maneira similar ao β -*hairpin*, o peptídeo sintético *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂ apresentou atividade contra a bactéria Gram-positiva marinha *M. marytropicum* (ALF-E₃₃₋₅₂ 20-40 μ M) (Quadro 3). O peptídeo sintético derivado de ALF-F em β -*hairpin* não apresentou atividade contra nenhum microrganismo testado (Capítulo II, Seção A), no entanto o peptídeo sintético *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ apresentou atividade contra as bactérias Gram-positivas *M. luteus* (10-20 μ M), *M. marytropicum* (5-10 μ M) e *B. stationis* (10-20 μ M) e Gram-negativas *E. coli* (5-10 μ M) e *V. nigripulchritudo* (2,5-5 μ M) (Quadro 3). O peptídeo sintético *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ apresentou o maior espectro de atividade antimicrobiana, apresentando atividade contra todos os microrganismos testados (Quadro 3).

Quadro 3 - Espectro de atividade antimicrobiana de peptídeos sintéticos derivados dos ALFs dos Grupos E, F e G de *Litopenaeus vannamei*

	Litvan ALF-E				Litvan ALF-F				Litvan ALF-G			
	<i>Litvan</i> ALF-E33-52		β -hairpin Cap II, Seção A		<i>Litvan</i> ALF-F31-50		β -hairpin Cap II, Seção A		<i>Litvan</i> ALF-G35-54		β -hairpin Cap II, Seção A	
Microrganismos	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gram-positivas												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	2,5-5	2,5-5	10-20	>40
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	2,5-5	2,5-5	10-20	>40
<i>Micrococcus luteus</i> CIP 5345	>40	>40	>40	>40	10-20	10-20	>40	>40	1,25-2,5	2,5-5	10-20	>40
<i>Microbacterium maritopicum</i> CIP 105733	20-40	20-40	20-40	>40	5-10	5-10	>40	>40	1,25-2,5	1,25-2,5	05-10	10-20
<i>Brevibacterium stationis</i> CIP 101282	>40	>40	20-40	>40	10-20	20-40	>40	>40	1,25-2,5	2,5-5	05-10	20-40
Gram-Negativas												
<i>Escherichia coli</i> SBS363	>40	>40	>40	>40	5-10	5-10	>40	>40	5-10	5-10	>40	>40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	10-20	>40	>40	>40
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	2,5-5	5-10	>40	>40
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	5-10	>40	>40	>40
<i>Vibrio nigripulchritudo</i> CIP103195	>40	>40	>40	>40	2,5-5	5-10	>40	>40	2,5-5	2,5-5	20-40	>40

Espectro de atividade antimicrobiana dos peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteína de novos ALFs e do β -hairpin (Capítulo II, Seção A). Os valores de MIC (concentração inibitória mínima) e MBC (concentração bactericida mínima) estão expressos em μ M. O intervalo representa a maior concentração de peptídeo em que houve crescimento microbiano e a menor concentração de peptídeo capaz de inibir 100% do crescimento microbiano. Em vermelho estão destacadas as concentrações que inibiram o crescimento bacteriano.

3.3. Ensaio de permeabilidade de membrana bacteriana

A fim de investigar o mecanismo de ação dos peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas, foi avaliada a sua capacidade de formação de poros em membrana bacteriana a partir do monitoramento da hidrólise do substrato ONPG pela β -galactosidase citoplasmática de *E. coli* ML35. O aumento na absorbância foi observado nos primeiros minutos de incubação com os peptídeos *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ e após 25 min de incubação com *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂ e com o detergente Triton X-10 (Figura 2). Não houve aumento significativo da absorbância nos poços incubados com água ultrapura estéril (solução diluente dos peptídeos) (Figura 2). Esses resultados indicam que os peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas de novos ALFs apresentam a capacidade de formar poros em membranas bacterianas assim como descrito para os AMPs catiônicos clássicos.

Figura 2- Ensaio de permeabilidade de membrana de *E. coli* ML35

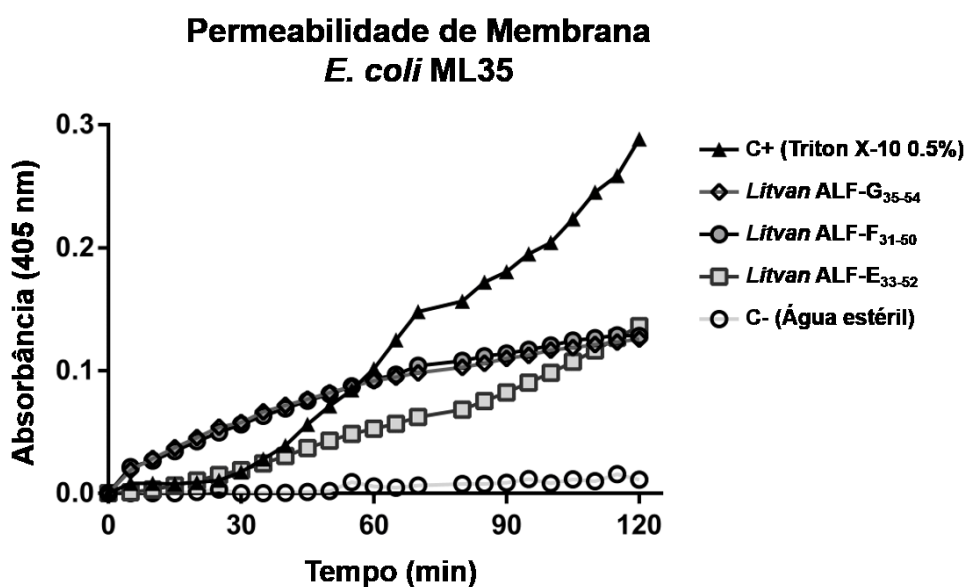


Gráfico de absorbância a 405 nm pelo tempo de incubação com os peptídeos sintéticos *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂, *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ e com os controles positivo (detergente Triton X-10 0.5%) e negativo (água ultrapura estéril). Medições foram realizadas a cada 5 min durante 2 h apontando a hidrólise do ONPG pelos peptídeos e controle positivo e indicando a permeabilização da membrana de *E. coli* ML35.

3.4. Atividade sinérgica de peptídeos sintéticos

A atividade sinérgica entre os peptídeos sintéticos foi avaliada somente contra as bactérias em que se observou atividade antimicrobiana individualmente (Quadro 3). Dessa maneira, a atividade antimicrobiana em sinergia de *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂, *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ foi avaliada contra a bactéria Gram-positiva marinha *M. maritipicum* CIP

105733 e de *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ contra as bactérias Gram-negativas *E. coli* SBS363 e *V. nigripulchritudo* CIP103195. Os valores do índice FIC para cada combinação entre os peptídeos sintéticos está disponível no Quadro 4. A ação combinada de *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂ e *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ não alterou a atividade antimicrobiana individual dos peptídeos (FIC = 2,0, sem sinergia). A ação combinada de *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂ e ½ MIC de *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ levou a uma redução de até 8 vezes a concentração necessária de *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂ para inibir o crescimento de *M. maritypicum* (FIC =0.65, com efeito sinérgico). A ação combinada de *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e ½ MIC de *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ levou a uma redução de até 2 vezes a concentração necessária de *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ para inibir o crescimento de *M. maritypicum* (FIC =1.0, com efeito sinérgico). A ação combinada de *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e ½ MIC de *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ levou a uma redução de até 8 vezes a concentração necessária de *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ para inibir o crescimento das bactérias *E. coli* e *V. nigripulchritudo* (FIC =0.65, com efeito sinérgico). Combinações com diluições abaixo de ½ MIC de *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ não apresentaram atividade antimicrobiana contra nenhuma das bactérias testadas, indicando que *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ é essencial para atividade sinérgica dos outros peptídeos.

Quadro 4 - Atividade antimicrobiana sinérgica entre os peptídeos sintetizados

	<i>Litvan</i> ALF-E ₃₃₋₅₂ + <i>Litvan</i> ALF-F ₃₁₋₅₀	<i>Litvan</i> ALF-E ₃₃₋₅₂ + <i>Litvan</i> ALF-G ₃₅₋₅₄	<i>Litvan</i> ALF-F ₃₁₋₅₀ + <i>Litvan</i> ALF-G ₃₅₋₅₄
<i>Microbacterium maritypicum</i> CIP 105733	2,0	0,625	1,0
<i>Escherichia coli</i> SBS363	nt	nt	0,625
<i>Vibrio nigripulchritudo</i> CIP103195	nt	nt	0,625

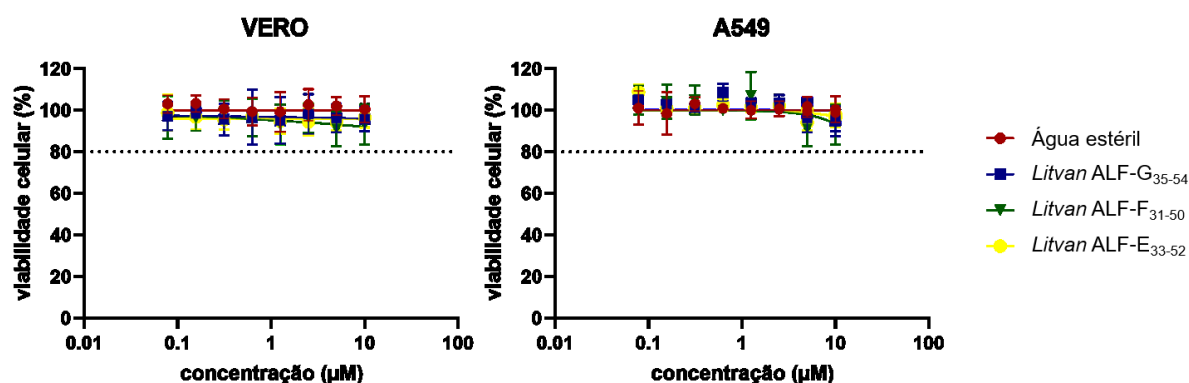
Concentração Inibitória Fracionária (FIC). $FIC = (A)/MIC_A + (B)/MIC_B$, onde MIC_A e MIC_B são os MICs dos peptídeos A e B testados sozinhos e (A) e (B) são os MICs dos peptídeos testados em conjunto. $FIC \leq 0.5$, forte efeito sinérgico; 0.5-1 com efeito sinérgico; ≥ 1 ; efeito aditivo; =2, sem efeito sinérgico; ≥ 2 efeito antagonista (SCHMITT *et al.*, 2012). **nt**: não testado

3.5. Efeito citotóxico de peptídeos sintéticos

O efeito citotóxico dos peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas foi avaliado contra duas linhagens celulares de mamíferos: células VERO e células A549. Optou-se pela escolha dessas linhagens celulares devido a sua utilização em ensaios futuros visando avaliar as atividades antiviral e antitumoral dos peptídeos. Não foi observado efeito citotóxico

em nenhuma das concentrações testadas em ambos os tipos celulares (10-0,03 μM ; viabilidade celular $> 95\%$) (Figura 3). Devido à baixa influência sobre a viabilidade celular nas concentrações testadas, não foi possível calcular o IC_{50} desses peptídeos. Optou-se por não avaliar o efeito citotóxico em concentrações mais altas de peptídeos, dado que 10 μM mostrou ser uma concentração inibitória para o crescimento da maioria das bactérias testadas (Quadro 3). Esses resultados indicam que os peptídeos sintéticos derivados de ALFs não são citotóxicos para células de mamíferos nas concentrações que apresentam atividade antibacteriana, reforçando o potencial biotecnológico dessas moléculas.

Figura 3 – Ensaio de citotoxicidade dos peptídeos derivados de ALFs contra células de mamíferos



Gráficos de viabilidade celular após 48h de incubação de células de mamíferos (VERO e A549) com peptídeos sintéticos *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂, *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ e *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄. Os valores representam as médias e o desvio padrão dos valores de viabilidade celular por concentração de peptídeo. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

4. Discussão

Peptídeos derivados de ALFs, que apresentam os resíduos de cisteína conservados, têm sido amplamente estudados na literatura e apresentam atividade e estrutura secundária similar à molécula nativa (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2016). A cisteína é um aminoácido polar com a capacidade de formação de ligações dissulfeto, que são essenciais para estabilização da estrutura tridimensional da molécula. Neste trabalho, foi demonstrado que peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas de novos ALFs apresentam uma estrutura secundária em α -hélice, diferente do encontrado na molécula nativa (HOESS *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 2009). Além da diferença observada na estrutura secundária, os peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas apresentam espectro de atividade antimicrobiana distinto dos peptídeos em β -hairpin. Esses resultados confirmam que alterações na estrutura aminoacídica primária representam uma importante alternativa para produção de

moléculas bioativas com propriedades distintas.

ALFs são peptídeos que apresentam alta afinidade de ligação a componentes microbianos, e sua afinidade a esses componentes tem sido descrita como essencial para sua atividade antimicrobiana (ROSA *et al.*, 2013). É proposto que a diversidade encontrada nas sequências aminoacídicas primárias de ALFs esteja associada à afinidade de ligação a diferentes componentes microbianos, ampliando o espectro de atividade dessa família de AMPs (ROSA *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2015). Os ensaios de atividade antimicrobiana demonstraram que os peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas apresentaram um espectro de atividade antimicrobiana maior do que o de peptídeos em *β -hairpin* (Quadro 3). Em conjunto com os resultados de permeabilidade de membrana, é possível hipotetizar que os peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas adotam um mecanismo de ação semelhante ao dos AMPs catiônicos clássicos (cAMPs) e diferente de ALFs nativos. No entanto, ensaios comparativos de ligação a componentes microbianos são necessários a fim de confirmar essa hipótese. cAMPs em α -hélice atuam sobre as membranas de microrganismos a partir de interações eletrostáticas com os fosfolípidos aniônicos e interações hidrofóbicas com a bicamada lipídica, levando à sua desestabilização (BROGDEN, 2005). Para isso, o ponto isoelétrico e a hidrofobicidade dos resíduos aminoacídicos que compõem os peptídeos apresentam papel essencial na sua atividade (JIANG *et al.*, 2008; LEPTIHN *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2014). Além de alterações na estrutura secundária esperada, peptídeos derivados da região entre cisteínas apresentaram um ponto isoelétrico maior do que os peptídeos em *β -hairpin*, o que pode contribuir para o aumento no espectro de atividade desses peptídeos.

Atualmente, os principais desafios na aplicação de AMPs como novos antibióticos são o custo de produção dessas moléculas, a citotoxicidade das formulações e a seleção de microrganismos resistentes a esses antibióticos (DIJKSTEEL *et al.*, 2021). Devido ao alto custo da síntese química de proteínas, a produção de AMPs com sequências aminoacídicas reduzidas tem sido proposta como uma alternativa (NELL *et al.*, 2006; VAN GROENENDAEL *et al.*, 2018). ALFs despontam como interessantes alvos de estudos para aplicação biotecnológica dado que peptídeos derivados do *β -hairpin* (22 resíduos aminoacídicos) apresentam atividade similar a molécula inteira (aproximadamente 100 resíduos aminoacídicos) (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2016). Neste trabalho, foi demonstrado que curtas sequências aminoacídicas derivadas da região entre cisteína de novos ALFs (20 resíduos aminoacídicos) apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade a células de mamíferos. Os peptídeos sintetizados neste trabalho se

mostraram capazes de formar poros em membranas de bactéria, diferentemente do que é observado na molécula nativa, indicando a versatilidade de moléculas bioativas que podem ser sintetizadas a partir de ALFs. A análise de sinergia dos peptídeos sintetizados neste trabalho demonstrou que combinações de *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂ e *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ com *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ apresentam atividade antimicrobiana em concentrações menores do que individualmente. O efeito sinérgico entre AMPs representa uma alternativa para redução no custo de produção de formulações antimicrobianas, devido à utilização de concentrações menores de AMPs. Além disso, as combinações de AMPs representam uma alternativa para superar mecanismos de resistência bacteriana (DUONG *et al.*, 2021). Dessa maneira, além da possibilidade de produção de pequenas sequências aminoacídicas com atividade antimicrobiana, os resultados deste trabalho indicam o potencial biotecnológico de peptídeos derivados de ALFs para superar os principais desafios na aplicação de AMPs como novos antimicrobianos.

Referências

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, 2005.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; STRUB, J. M.; VAN DORSSELAER, A.; BACHÈRE, E. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, n. 2, p. 335–346, 1999.

DIJKSTEEL, G. S.; ULRICH, M. M. W.; MIDDELKOOP, E.; BOEKEMA, B. K. H. L. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). **Frontiers in Microbiology**, 2021.

DUONG, L.; GROSS, S. P.; SIRYAPORN, A. Developing Antimicrobial Synergy With AMPs. **Frontiers in Medical Technology**, v. 0, p. 9, 2021.

GONZALEZ, M.; GUEGUEN, Y.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; et al. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 45, p. 17759–17764, 2007.

VAN GROENENDAEL, R.; KOX, M.; VAN EIJK, L. T.; PICKKERS, P. Immunomodulatory and kidney-protective effects of the human chorionic gonadotropin derivate EA-230. **Nephron**, 2018.

GUO, S.; LI, S.; LI, F.; ZHANG, X.; XIANG, J. Modification of a synthetic LPS-binding domain of anti-lipopolysaccharide factor from shrimp reveals strong structure-activity relationship in their antimicrobial characteristics. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 45, n. 2, p. 227–232, 2014.

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

JIANG, Z.; VASIL, A. I.; HALE, J. D.; et al. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. **Peptide Science**, v. 90, n. 3, p. 369–383, 2008.

LEPTIHN, S.; HAR, J. Y.; WOHLAND, T.; DING, J. L. Correlation of charge, hydrophobicity, and structure with antimicrobial activity of S1 and MIRIAM peptides. **Biochemistry**, v. 49, n. 43, p. 9161–9170, 2010.

LEWIES, A.; DU PLESSIS, L. H.; WENTZEL, J. F. Antimicrobial Peptides: the Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 370–381, 2019.

LI, S.; GUO, S.; LI, F.; XIANG, J. Functional Diversity of Anti-Lipopolysaccharide Factor Isoforms in Shrimp and Their Characters Related to Antiviral Activity. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2602–2616, 2015.

NELL, M. J.; TJABRINGA, G. S.; WAFELMAN, A. R.; et al. Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. **Peptides**, v. 27, n. 4, p. 649–660, 2006.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. a006049, 2012.

REN, Q.; ZHANG, Z.; LI, X.; et al. Three different anti-lipopolysaccharide factors identified from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 766–774, 2012.

ROSA, R. D.; VERGNES, A.; DE LORGERIL, J.; 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, 2013.

SCHMITT, P.; LORGERIL, J. DE; 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*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 37, n. 3–4, p. 363–370, 2012.

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

SILVA, I. T. Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba). **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO** - Universidade Federal de Santa Catarina Centro De Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2009.

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

SOMBOONWIWAT, K.; BACHÈRE, E.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. 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.

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

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

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

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

YANG, H.; LI, S.; LI, F.; XIANG, J. Structure and bioactivity of a modified peptide derived from the LPS-binding domain of an anti-lipopolysaccharide factor (ALF) of shrimp. **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, p. 96, 2016.

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

6. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, foi caracterizada a diversidade molecular de ALFs em camarões peneídeos. Demonstrou-se que a diversidade dessa família de AMPs é maior do que o descrito na literatura e que sete grupos distintos de ALFs (Grupos A a G) são encontrados em camarões peneídeos. Os grupos de ALFs são codificados por genes distintos que compartilham a mesma estrutura gênica e codificam peptídeos com propriedades bioquímicas, perfil de expressão gênica e atividade antimicrobiana distintos. Membros dos sete grupos de ALFs foram identificados em diferentes espécies de camarões peneídeos (subordem Dendrobranchiata) indicando que esses genes são parálogos e evoluíram a partir de eventos de duplicação gênica em um ancestral comum antes dos eventos de especiação. A diversidade de sequências de ALFs não é exclusiva de camarões peneídeos, mas sim amplamente encontrada em outros crustáceos decápodes como caranguejos, lagostas, lagostins (subordem Pleocyemta). Curiosamente, enquanto apenas uma isoforma de ALF é encontrada em quelicerados marinhos, eventos de expansão gênica e diversificação de sequências codificantes de ALFs parecem ter moldado a evolução dessa família de AMPs em crustáceos (REN *et al.*, 2012; SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016).

Estudos de silenciamento pós-transcricional por RNA de interferência (RNAi) demonstraram que os ALFs são essenciais para a sobrevivência dos animais, auxiliando na manutenção da sua microbiota e protegendo contra infecções patogênicas (de la VEGA *et al.*, 2008; PONPRATEEP *et al.*, 2012). É provável que eventos de duplicação gênica e diversificação de ALFs em crustáceos estejam associados à adaptação a diferentes ambientes, patógenos e microrganismos comensais. Ainda são poucos os estudos acerca da história evolutiva de ALFs em crustáceos e, até o momento, estão restritos a espécies de interesse comercial (REN *et al.*, 2012; SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). Com o avanço das técnicas de sequenciamento, cada vez mais sequências de diferentes espécies de crustáceos têm sido adicionadas aos bancos de dados públicos. Assim, novos estudos serão necessários a fim de elucidar a história evolutiva dessa família e propor um sistema de classificação geral que englobe ALFs de crustáceos e quelicerados marinhos.

É proposto que a diversidade de sequências em uma família de AMP seja resultado da seleção de diferentes isoformas ampliando o seu espectro de atividade antimicrobiana ou adquirindo novas funções imunológicas (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). Apesar de a diversidade observada em nível de estrutura aminoacídica primária, a

estrutura tridimensional (3D) dos ALFs se mantém conservada nos diferentes grupos. Análises moleculares da diversidade de ALFs em crustáceos apontam que a seleção opera em sítios específicos de aminoácidos e não na sequência completa do peptídeo (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). Regiões essenciais para o funcionamento do peptídeo encontram-se sob influência de seleção negativa, dado que pequenas alterações aminoacídicas podem comprometer a sua atividade. Em contrapartida, alguns códons estão sob influência de seleção positiva, uma vez que pequenas mudanças na estrutura aminoacídica primária podem aumentar o potencial antimicrobiano do peptídeo (REN *et al.*, 2012; SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016). Dessa maneira, ao passo que a estrutura 3D de ALFs é conservada, observou-se que resíduos envolvidos na ligação a LPS não são conservados em todos os ALFs.

Estudos com ALFs de crustáceos demonstraram que além de afinidade com o lipídeo A do LPS (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008), os ALFs também apresentam afinidade com outros componentes microbianos como o ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008) e β -glicanas de fungos (SUN *et al.*, 2011). Dado que a alta afinidade desses peptídeos a componentes microbianos é tida como essencial para a sua atividade antimicrobiana (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2016), é possível que a diversidade encontrada nas sequências esteja associada à afinidade de ligação a diferentes componentes microbianos, ampliando o espectro de atividade dessa família de AMPs. Contudo, estudos comparativos futuros avaliando a afinidade de ligação de ALFs de cada grupo são necessários para confirmar essa hipótese. Além da diversidade observada em nível de sequência, foi demonstrado que os ALFs de diferentes grupos apresentam espectros de atividade antimicrobiana distintos. Comparando os resultados obtidos nos testes de atividade antimicrobiana com a literatura, observa-se que a diversidade funcional dos ALFs está relacionada aos grupos em que são classificados e não às espécies em que são encontrados. Enquanto alguns grupos apresentam amplo espectro de atividade (Grupos B, C e G) em diferentes espécies de camarões peneídeos, outros apresentam atividade antimicrobiana restrita (Grupo E) ou até mesmo baixa (Grupos A, D e F) (ROSA *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015).

Além da análise da diversidade de ALFs, neste estudo foram identificadas e caracterizadas sequências de peptídeos relacionados a ALFs apresentando três ou quatro resíduos de cisteínas, aqui denominadas *ALFs-like*. Reconstruções filogenéticas com ALFs de quelicerados marinhos e crustáceos e scygonadinas revelaram que esses peptídeos não são

ALFs autênticos, mas compõem um grupo irmão relacionado às scygonadinas. Tanto os ALFs quanto scygonadinas e *ALFs-like* apresentam uma estrutura gênica conservada composta por três éxons e dois íntrons, indicando que todos derivaram de um gene ancestral comum. De maneira muito similar ao observado em ALFs, *ALFs-like* e scygonadinas, estudos em *Drosophila* sugerem que andropinas e cecropinas derivaram de um mesmo gene ancestral ao longo do curso evolutivo da família multigênica das cecropinas (DATE-ITO *et al.*, 2002). É proposto que cecropinas derivaram de quatro eventos de duplicação gênica e dois rearranjos cromossômicos (DATE-ITO *et al.*, 2002). Dessa maneira andropinas teriam emergido a partir de um desses eventos de duplicação e evoluíram de maneira independente, apresentando um perfil de expressão distinto e restrito ao ducto ejaculatório (SAMAKOVLIS *et al.* 1991; DATE-ITO *et al.*, 2002). Os resultados de diversidade molecular demonstraram que uma série de eventos de duplicação gênica moldaram a história evolutiva de ALFs em crustáceos. Esses resultados sugerem que um gene ancestral tenha dado origem aos ALFs e às scygonadinas em caranguejos do gênero *Scylla* e aos ALFs e aos *ALFs-like* em camarões peneídeos, que evoluíram de maneira independente apresentando perfis de expressão distintos.

A diversidade dos ALFs de camarões peneídeos também foi verificada na distribuição da sua expressão gênica. Todos os genes codificantes para ALFs se mostraram expressos simultaneamente em hemócitos circulantes, porém transcritos de alguns grupos também foram detectados em outros tecidos. Dado que esses animais apresentam um sistema circulatório semi-aberto ou aberto, é esperado que a expressão de genes relacionados ao sistema imune em diferentes tecidos esteja associada à presença de hemócitos infiltrados (MUÑOZ *et al.*, 2002; SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2018). A imunodeteção de ALFs do Grupo B em lâminas histológicas de cefalotórax e tecido muscular, confirmou que a expressão gênica desse grupo de ALFs é restrita a hemócitos infiltrados (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008). Apesar de clara a importância dos hemócitos na expressão de ALFs, neste trabalho foi observada uma alta expressão de ALFs do Grupo C em brânquias e do Grupo F em estômago, indicando que outros tecidos, ou população específicas de hemócitos residentes e/ou infiltrados, possam contribuir na expressão de alguns genes de ALFs. De maneira contrastante ao observado para ALFs, os *ALFs-like* não se mostraram expressos em hemócitos circulantes, mas sim em estômago, intestino, cordão nervoso, pedúnculo ocular e, principalmente, nas gônadas. AMPs expressos em gônadas têm sido descritos em diferentes espécies de artrópodes e moluscos, indicando uma relação entre o sexo dos animais e a expressão de AMPs específicos (SAMAKOVLIS *et al.*, 1991; MARCHINI *et al.*, 1993; WANG *et al.* 2007; ZHENG *et al.*,

2012; QIN *et al.*, 2014; JACOBS *et al.*, 2016). Esses estudos apontam a importância de AMPs na proteção contra infecções nas gônadas e manutenção da microbiota no trato reprodutivo e no ambiente de ovoposição desses animais (XU *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2012; JACOBS *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2022). Dessa maneira, é possível hipotetizar que enquanto os ALFs representam um importante grupo de efetores imunológicos da imunidade sistêmica, os *ALFs-like* atuam na proteção de epitélios específicos como os das gônadas desses animais.

AMPs são importantes efetores imunológicos e uma série de funções imunes, além da atividade direta contra microrganismos tem sido descrita para esses peptídeos. Devido a essas características, alguns autores propõem a utilização do termo “*host defense peptides*” para melhor compreender as distintas funções imunes dessas moléculas (HANCOCK; HANEY; GILL, 2016). Em conjunto com outros efetores imunes, os AMPs apresentam um papel central na regulação das respostas de defesa contra microrganismos e manutenção da homeostase dos animais. Neste estudo, foi demonstrado que a expressão de ALFs em hemócitos é modulada não apenas por infecções microbianas, mas também pela injúria tecidual causada pela infecção experimental. A indução da expressão frente à injúria pode estar associada a padrões moleculares associados a perigo (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs). DAMPs são capazes de ativar as vias de sinalização celular culminando na ativação da família NF- κ B/Rel de fatores de transcrição (NEWTON; DIXIT, 2012), que regulam a expressão de uma série de moléculas do sistema imune, incluindo os ALFs (KAMSAENG *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017). Em crustáceos, outros AMPs como crustinas e stylicinas também têm sua expressão induzida por injúria, indicando o possível envolvimento dessas moléculas em processos de regeneração tecidual (BARRETO *et al.*, 2018; FARIAS *et al.*, 2019). No entanto, até o momento, pouco se conhece acerca do mecanismo de ação de AMPs de crustáceos no processo de reparação de danos teciduais. Curiosamente, enquanto os ALFs são induzidos frente injúrias e infecções microbianas (PONPRATEEP *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2014), scygonadinas e *ALFs-like* têm sua expressão induzida durante a maturação das gônadas e não frente a estímulos microbianos (XU *et al.*, 2011; QIAO *et al.*, 2016). Esse mesmo perfil de expressão é observado em outros AMPs de expressão exclusiva em gônadas (SAMAKOVLIS *et al.*, 1991; ZHENG *et al.*, 2012; QIN *et al.*, 2014). Além da defesa contra infecções no trato reprodutivo, é possível que esses peptídeos apresentem outras funções biológicas, contribuindo para a maturação sexual desses animais.

A seleção de microrganismos multiresistentes aos antibióticos convencionalmente utilizados representa um dos principais problemas de saúde pública mundial (MAGANA *et al.*,

2020). O estudo de AMPs tem crescido nas últimas décadas e desponta como uma alternativa para o desenvolvimento de novos antimicrobianos e para o tratamento de bactérias multirresistentes (DIJKSTEEL *et al.*, 2021; DUONG *et al.*, 2021). Ensaios pré-clínicos têm demonstrado o potencial de AMPs para o tratamento e prevenção de uma série de condições clínicas, como tratamento de infecções bacterianas em queimaduras (BJÖRN *et al.*, 2015), restauração da função pulmonar após pneumonia (HOU *et al.*, 2013) e inibição de biofilmes (SEGEV-ZARKO *et al.*, 2015). Devido ao sucesso desses ensaios, alguns AMPs têm sido aprovados e testados em ensaios clínicos (revisado por GREBER; DAWGUL *et al.*, 2017 e DIJKSTEEL *et al.*, 2021). Apesar dos resultados promissores, alguns desafios como o custo de produção dessas moléculas, a citotoxicidade das formulações e a seleção de microrganismos resistentes a esses antibióticos dificultam a aplicação desses peptídeos na clínica. Os ALFs representam interessantes alvos de estudos para aplicação biotecnológica dado que peptídeos derivados do β -hairpin (22 resíduos aminoácidos) apresentam atividade similar a molécula inteira (aproximadamente 100 resíduos aminoácidos) (YANG *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2013; SOMBOONWIWAT *et al.*, 2005). Neste trabalho, foi demonstrado que curtas sequências aminoácidas derivadas da região entre cisteína de novos ALFs (20 resíduos aminoácidos) apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade a células de mamíferos. A análise de sinergia dos peptídeos sintetizados neste trabalho demonstrou que combinações de *Litvan* ALF-E₃₃₋₅₂ e *Litvan* ALF-F₃₁₋₅₀ com *Litvan* ALF-G₃₅₋₅₄ apresentam atividade antimicrobiana em concentrações menores do que quando analisados individualmente. O efeito sinérgico entre AMPs representa uma alternativa para redução no custo de produção de formulações antimicrobianas, devido à utilização de concentrações menores de AMPs. Além disso, as combinações entre AMPs e de AMPs com outros antimicrobianos representam uma alternativa para superar mecanismos de resistência bacteriana (DUONG *et al.*, 2021). Curiosamente, os peptídeos sintetizados neste trabalho apresentaram uma estrutura secundária diferente do encontrado na molécula nativa e se mostraram capazes de formar poros em membranas bacterianas. É possível hipotetizar que os peptídeos sintéticos derivados da região entre cisteínas adotam um mecanismo de ação semelhante ao dos AMPs catiônicos clássicos (cAMPs) e diferente de ALFs nativos. Esses resultados indicam a versatilidade de moléculas bioativas que podem ser sintetizadas a partir de ALFs, reforçando o potencial biotecnológico dessa família de AMPs.

Neste estudo, a diversidade molecular, transcricional e funcional de ALFs e *ALFs-like* foram caracterizadas em camarões peneídeos. Os resultados obtidos contribuem para o

entendimento da história evolutiva dessa família de AMPs e reforçam a hipótese de divergência funcional desses peptídeos neste grupo de artrópodes. Além da diversidade em nível de sequência, esses peptídeos apresentam perfil de expressão distintos e diferentes tecidos se mostraram envolvidos na sua expressão. Curiosamente, a expressão desses peptídeos se mostrou induzida frente a outros estímulos além dos microbianos, indicando o seu envolvimento em outros processos biológicos além da atividade direta contra microrganismos. Por fim, foi demonstrado que peptídeos derivados da região entre cisteína de ALFs apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade a células de mamíferos, reforçando o seu potencial biotecnológico para produção de novos agentes antimicrobianos. Esses resultados confirmam a importância dos ALFs no sistema imune de camarões peneídeos e reforçam o seu potencial para aplicação direta em sanidade aquícola e para o desenvolvimento de novos antibióticos derivados de AMPs.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

7.1. Conclusão

Os ALFs de camarões peneídeos compõem uma família multigênica de peptídeos antimicrobianos, diversa em nível de sequência, perfil de expressão gênica e atividade antimicrobiana. Ademais, peptídeos derivados da região entre cisteínas de ALFs, apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade a células de mamíferos, representando uma alternativa biotecnológica para produção de novos antimicrobianos.

7.2. Perspectivas

- Analisar a diversidade molecular de ALFs e *ALFs-like* em outros táxons de crustáceos a fim de confirmar a história evolutiva dessa família;
- Propor um sistema de classificação que abranja ALFs, *ALFs-like* e scygonadinas com base na diversidade encontrada em crustáceos;
- Localizar os sítios de expressão dos diferentes grupos de ALFs por hibridização *in situ* a fim de confirmar se a expressão desses peptídeos está restrita a hemócitos infiltrados;
- Investigar a participação de ALFs e *ALFs-like* nas respostas de defesa *in vivo* a partir do seu silenciamento pós-transcricional via RNA de interferência;
- Avaliar o espectro de atividade antimicrobiana dos *ALFs-like*;
- Realizar ensaios comparativos de afinidade de ligação entre os peptídeos derivados de ALFs e diferentes componentes microbianos (LPS, LTA e β -glicana);
- Avaliar a atividade antiviral, atitumoral e antiparasitária dos peptídeos derivados de ALFs.

REFERÊNCIAS

- ASCHE, F.; ANDERSON, J. L.; BOTTA, R. et al. The economics of shrimp disease. **Journal of invertebrate pathology**, p. 107397, 2020.
- BARRETO, C.; DA ROSA COELHO, J.; YUAN, J.; 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, 2018.
- BECKING, T.; DELAUNAY, C.; CORDAUX, R.; et al. Shedding light on the antimicrobial peptide arsenal of terrestrial isopods: Focus on armadillidins, a new crustacean AMP family. **Genes**, v. 11, n. 1, 2020.
- BJÖRN, C.; NOPPA, L.; NÄSLUND SALOMONSSON, E.; et al. Efficacy and safety profile of the novel antimicrobial peptide PXL150 in a mouse model of infected burn wounds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 5, p. 519–524, 2015.
- BRIGGS, M.; SMITH, F.; SUBASINGHE, R. et al. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. **RAP Publication 2004/10 - FAO Regional Office for Asia and the Pacific**. p 92 (2004).
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, 2005.
- BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 169–184, 2004.
- CHOUDHARY, A.; NAUGHTON, L. M.; MONTÁNCHEZ, I.; DOBSON, A. D. W.; RAI, D. K. Current status and future prospects of Marine Natural Products (MNPs) as antimicrobials. **Marine Drugs**, 2017.
- DATE-ITO, A.; KASAHARA, K.; SAWAI, H.; CHIGUSA, S. I. Rapid evolution of the male-specific antibacterial protein Andropin gene in *Drosophila*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 54, n. 5, p. 665–670, 2002.
- DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; et al. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, p. 28398–28406, 1997.
- DIJKSTEEL, G. S.; ULRICH, M. M. W.; MIDDELKOOP, E.; BOEKEMA, B. K. H. L. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). **Frontiers in Microbiology**, 2021.
- DUONG, L.; GROSS, S. P.; SIRYAPORN, A. Developing Antimicrobial Synergy With AMPs. **Frontiers in Medical Technology**, v. 0, p. 9, 2021.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. **Sustainability in action**. Rome, p. #244, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

FARIAS, N. D.; FALCHETTI, M.; MATOS, G. M.; et al. Litopenaeus vannamei stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, p. 82–92, 2019.

FLEGEL, T. W. A future vision for disease control in shrimp aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 2, p. 249–266, 2019.

GONCALVES, P.; GUERTLER, C.; BACHÈRE, E.; et al. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, 2014.

GREBER, K.; DAWGUL, M. Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 620–628, 2017.

GROSS, P. S.; BARTLETT, T. C.; BROWDY, C. L.; CHAPMAN, R. W.; WARR, G. W. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 7, p. 565–577, 2001.

GUO, S.; LI, S.; LI, F.; ZHANG, X.; XIANG, J. Modification of a synthetic LPS-binding domain of anti-lipopolysaccharide factor from shrimp reveals strong structure-activity relationship in their antimicrobial characteristics. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 45, n. 2, p. 227–232, 2014.

HANCOCK, R. E. W.; HANEY, E. F.; GILL, E. E. The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. **Nature Reviews Immunology**, 2016.

HARRIS, F.; DENNISON, S.; PHOENIX, D. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, n. 6, p. 585–606, 2009.

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

HOU, M.; ZHANG, N.; YANG, J.; et al. Antimicrobial peptide LL-37 and IDR-1 ameliorate MRSA pneumonia in vivo. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 614–623, 2013.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2019. https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2019_v47_br_informativo.pdf

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

JACOBS, C. G. C.; STEIGER, S.; HECKEL, D. G.; et al. Sex, offspring and carcass determine antimicrobial peptide expression in the burying beetle. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2016.

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

KAMSAENG, P.; TASSANAKAJON, A.; SOMBOONWIWAT, K. Regulation of antilipopolysaccharide factors, ALFPm3 and ALFPm6, in *Penaeus monodon*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Nature

KULKARNI, A.; KRISHNAN, S.; ANAND, D.; et al. Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 431–459, 2021.

de la VEGA, E.; O'LEARY, N. A.; SHOCKEY, J. E.; et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1916–1925, 2008.

LAI, A. G.; ABOOBAKER, A. A. Comparative genomic analysis of innate immunity reveals novel and conserved components in crustacean food crop species. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–26, 2017.

LEWIES, A.; DU PLESSIS, L. H.; WENTZEL, J. F. Antimicrobial Peptides: the Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 370–381, 2019.

LI, S.; GUO, S.; LI, F.; XIANG, J. Characterization and function analysis of an anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 46, n. 2, p. 349–355, 2014.

LI, S.; GUO, S.; LI, F.; XIANG, J. Functional Diversity of Anti-Lipopolysaccharide Factor Isoforms in Shrimp and Their Characters Related to Antiviral Activity. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2602–2616, 2015.

LIU, Y.; CUI, Z.; LI, X.; SONG, C.; SHI, G. A newly identified anti-lipopolysaccharide factor from the swimming crab *Portunus trituberculatus* with broad spectrum antimicrobial activity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 2, p. 463–470, 2013.

MAGANA, M.; PUSHPANATHAN, M.; SANTOS, A. L.; et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, 2020.

MARCHINI, D.; GIORDANO, P. C.; AMONS, R.; BERNINI, L. F.; DALLAI, R. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (insecta:Diptera). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 23, n. 5, p. 591–598, 1993.

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

MORITA, T.; OHTSUBO, S.; NAKAMURA, T.; et al. Isolation and biological activities of

limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). **Journal of Biochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1611–1620, 1985.

MUÑOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; SAULNIER, D.; BACHÈRE, E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 11, p. 2678–2689, 2002.

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

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. a006049, 2012.

NIU, G. J.; XU, J. D.; YUAN, W. J.; et al. Protein inhibitor of activated STAT (PIAS) negatively regulates the JAK/STAT pathway by inhibiting STAT phosphorylation and translocation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

PENG, J.; WEI, P.; ZHANG, B.; et al. Gonadal transcriptomic analysis and differentially expressed genes in the testis and ovary of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **BMC genomics**, v. 16, n. 1, 2015.

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

QIAO, K.; XU, W. F.; CHEN, H. Y.; et al. A new antimicrobial peptide SCY2 identified in *Scylla Paramamosain* exerting a potential role of reproductive immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 51, p. 251–262, 2016.

QIN, C. L.; HUANG, W.; ZHOU, S. Q.; et al. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 362–370, 2014.

QUISPE, R. L.; JUSTINO, E. B.; VIEIRA, F. N.; 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, 2016.

REN, Q.; ZHANG, Z.; LI, X.; et al. Three different anti-lipopolysaccharide factors identified from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 766–774, 2012.

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

ROSA, R. D.; VERGNES, A.; DE LORGERIL, J.; 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, 2013.

SAMAKOVLIS, C.; KYLSTEN, P.; KIMBRELL, D. A.; ENGSTROM, A.; HULTMARK, D. The Andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. **EMBO Journal**, v. 10, n. 1, p. 163–169, 1991.

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

SCHNAPP, D.; KEMP, G. D.; SMITH, V. J. Purification and Characterization of a Proline-Rich Antibacterial Peptide, with Sequence Similarity to Bactenecin-7, from the Haemocytes of the Shore Crab, *Carcinus Maenas*. **European Journal of Biochemistry**, v. 240, n. 3, p. 532–539, 1996.

SEIFFERT W. Q.; WINCKLER S.; MAGGIONI D. A mancha branca em Santa Catarina. **Panorama Aqüicultura** 87, 2005.

SEGEV-ZARKO, L.; SAAR-DOVER, R.; BRUMFELD, V.; MANGONI, M. L.; SHAI, Y. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. **Biochemical Journal**, v. 468, n. 2, p. 259–270, 2015.

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

SMITH, V. J.; DYRYNDA, E. A. Antimicrobial proteins: From old proteins, new tricks. **Molecular Immunology**, v. 68, n. 2, p. 383–398, 2015. Elsevier Ltd.

SOMBOONWIWAT, K.; BACHÈRE, E.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. 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.

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

STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, Å.; BENNICH, H.; BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246–248, 1981.

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

SUN, J. J.; XU, S.; HE, Z. H.; et al. Activation of Toll pathway is different between kuruma shrimp and *Drosophila*. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 20, 2017.

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

TANAKA, S.; NAKAMURA, T.; MORITA, T.; IWANAGA, S. Limulus anti-LPS factor: An anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of Limulus coagulation system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 105, n. 2, p. 717–723, 1982.

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

THARNTADA, S.; PONPRATEEP, S.; SOMBOONWIWAT, K.; et al. Role of anti-lipopolysaccharide factor from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection from white spot syndrome virus infection. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 6, p. 1491–1498, 2009.

WANG, K. J.; HUANG, W. S.; YANG, M.; et al. A male-specific expression gene, encodes a novel anionic antimicrobial peptide, scygonadin, in *Scylla serrata*. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 8, p. 1961–1968, 2007.

WANG, X. W.; XU, J. D.; ZHAO, X. F.; VASTA, G. R.; WANG, J. X. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11779–11790, 2014.

WILMES, M.; CAMMUE, B. P. A.; SAHL, H. G.; THEVISSSEN, K. Antibiotic activities of host defense peptides: More to it than lipid bilayer perturbation. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 8, p. 1350–1358, 2011.

XU, W. F.; QIAO, K.; HUANG, S. P.; et al. The expression pattern of scygonadin during the ontogenesis of *Scylla paramamosain* predicting its potential role in reproductive immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 10, p. 1078–1090, 2011.

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

ZHENG, H.; ZHOU, L.; YANG, X.; WANG, D.; LIU, J. Cloning and characterization of a male-specific defensin-like antimicrobial peptide from the tick *Haemaphysalis longicornis*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 37, n. 1, p. 207–211, 2012.

ZHU, J. J.; YE, Z. Z.; LI, C. S.; et al. Identification and molecular characterization of a novel anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 43–50, 2019.

APÊNDICE

Artigo em primeira autoria desenvolvido durante o doutorado sanduíche.

Apêndice 1: Matos *et al.* 2021. Experimental microevolution of *Trypanosoma cruzi* reveals hybridization and clonal mechanisms driving rapid diversification of genome sequence and structure

DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.10.24.465605>

Research article

Experimental microevolution of *Trypanosoma cruzi* reveals hybridization and clonal mechanisms driving rapid diversification of genome sequence and structure.

Gabriel M. Matos^{1,2}, Michael D. Lewis³, Carlos Talavera-López¹, Matthew Yeo³, Edmundo C. Grisard⁴, Louisa A. Messenger³, Michael A. Miles³, Björn Andersson¹

¹ - Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

² - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

³ - Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom.

⁴ - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Corresponding author: Björn Andersson, bjorn.andersson@ki.se

Running title: Following genetic exchange in *Trypanosoma cruzi* in real time using whole genome sequencing reveals tetraploid and triploid stages

ANEXOS

Artigos em coautoria desenvolvidos durante o doutorado.

Anexo 1: Silveira *et al.*, 2018. 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.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.10.005>

Developmental and Comparative Immunology 79 (2018) 44–50



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

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



Short communication

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



Amanda S. Silveira ^a, Gabriel M. Matos ^a, Marcelo Falchetti ^a, Fabio S. Ribeiro ^a,
Albert Bressan ^a, Evelyne Bachère ^b, Luciane M. Perazzolo ^a, Rafael D. 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 Ifremer, UMR 5244, IHPE Interactions-Hosts-Pathogens-Environment, UPVD, CNRS, Université de Montpellier, CC 080, F-34095 Montpellier, France

Anexo 2: Farias *et al.*, 2019. *Litopenaeus vannamei* stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections.

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

Fish and Shellfish Immunology 86 (2019) 82–92



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,*}

^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 Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2373223, Valparaíso, Chile

^c Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia, 34090, Montpellier Cedex 5, France

Anexo 3: Bandeira *et al.*, 2020. A Type IIa crustin from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (crusFpau) is constitutively synthesized and stored by specific granule-containing hemocyte subpopulations.

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

Fish and Shellfish Immunology 97 (2020) 294–299



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

Anexo 4: Talavera-López *et al.*, 2021: Repeat-Driven Generation of Antigenic Diversity in a Major Human Pathogen, *Trypanosoma cruzi*.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.614665>



Repeat-Driven Generation of Antigenic Diversity in a Major Human Pathogen, *Trypanosoma cruzi*

Carlos Talavera-López^{1,2*}, Louisa A. Messenger³, Michael D. Lewis³, Matthew Yeo³, João Luís Reis-Cunha⁴, Gabriel Machado Matos⁵, Daniella C. Bartholomeu⁴, José E. Calzada⁶, Azael Saldaña⁶, Juan David Ramírez⁷, Felipe Guhl⁸, Sofía Ocaña-Mayorga⁹, Jaime A. Costales⁹, Rodion Gorchakov¹⁰, Kathryn Jones¹⁰, Melissa S. Nolan¹⁰, Santuza M. R. Teixeira¹¹, Hernán José Carrasco¹², María Elena Bottazzi¹⁰, Peter J. Hotez¹⁰, Kristy O. Murray¹⁰, Mario J. Grijalva^{9,13}, Barbara Burleigh¹⁴, Edmundo C. Grisard¹⁵, Michael A. Miles³ and Björn Andersson^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Julius Lukes,
Academy of Sciences of the Czech
Republic (ASCR), Czechia

Anexo 5: Stambuk *et al.*, 2021. Big defensin from the scallop *Argopecten purpuratus* ApBD1 is an antimicrobial peptide which entraps bacteria through nanonets formation.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.10.037>

Fish and Shellfish Immunology 119 (2021) 456–461



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Fish and Shellfish Immunology

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



Big defensin from the scallop *Argopecten purpuratus* ApBD1 is an antimicrobial peptide which entraps bacteria through nanonets formation

Felipe Stambuk^a, Claudia Ojeda^a, Gabriel Machado Matos^b, Rafael Diego Rosa^b, Luis Mercado^a, Paulina Schmitt^{a,*}

^a Grupo de Marcadores Inmunológicos, Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

^b Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

