



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Cássia Faustino dos Santos

**Caracterização molecular de uma nova defensina na ostra nativa**  
***Crassostrea gasar***

Florianópolis

2025

Cássia Faustino dos Santos

**Caracterização molecular de uma nova defensina na ostra nativa**  
***Crassostrea gasar***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis

2025

## Ficha catalográfica para trabalhos acadêmicos

Santos, Cássia Faustino dos  
Caracterização molecular de uma nova defensina na ostra  
nativa *Crassostrea gasar* / Cássia Faustino dos Santos ;  
orientador, Rafael Diego da Rosa, 2025.  
38 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

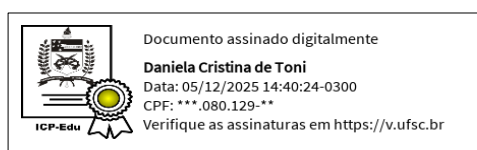
1. Ciências Biológicas. 2. peptídeos antimicrobianos.  
3. moluscos bivalves. 4. imunologia. 5. bioinformática..  
I. Rosa, Rafael Diego da. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III.  
Título.

Cássia Faustino dos Santos

**Caracterização molecular de uma nova defensina na ostra nativa *Crassostrea gasar***

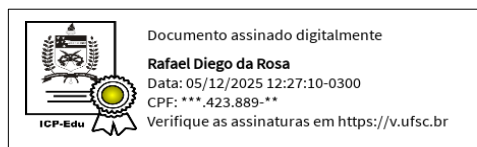
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Licenciada e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

CCB sala PG06, 25 de novembro de 2025.



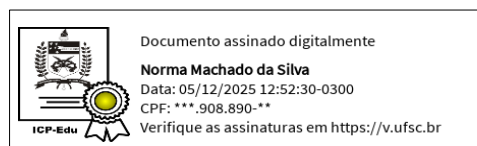
Coordenação do Curso

**Banca examinadora**

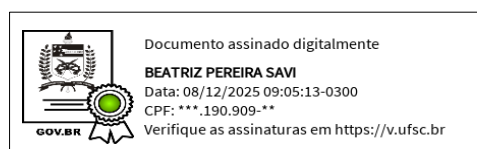


Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Orientador



Profa. Dra. Norma Machado da Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina



MSc. Beatriz Pereira Savi  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2025.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha família, em especial meus pais, que desde sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas e moldaram meus valores, mesmo com a dor da distância, principalmente ao meu pai, que nunca desistiu de se formar e se tornou uma inspiração para mim. Agradeço também a todos os professores pela minha formação, em especial meu orientador, Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa, que sempre valorizou o desenvolvimento científico e pensamento crítico, e por todos os ensinamentos de vida. Agradeço às minhas amigas e aos meus colegas de laboratório que sempre me ajudaram e incentivaram. Importante mencionar os órgãos de fomento PIBIC/CNPq e as políticas públicas da universidade, como a bolsa estudantil e a moradia estudantil, que garantiram minha permanência durante minha formação, longe da cidade natal. Por fim, agradeço à minha eu do passado pela resiliência.

## RESUMO

A ostra nativa *Crassostrea gasar* possui significativa relevância econômica para a aquicultura nacional, ocupando a segunda posição em produção no país. Por atuarem como organismos filtradores, esses moluscos estão permanentemente expostos a uma diversidade de microrganismos, incluindo agentes patogênicos. Para combater essas ameaças, as ostras desenvolveram um sistema imunológico inato eficiente, que conta com a ação de peptídeos antimicrobianos (AMPs). As defensinas  $CS\alpha\beta$  de invertebrados representam uma classe proeminente de AMPs, categorizadas em dois principais subgrupos filogenéticos com base em suas assinaturas moleculares: *mollusk-like* (característico de moluscos) e *arthropod-like* (característico de artrópodes). Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar molecularmente genes de defensinas em *C. gasar*. Através de uma abordagem de mineração *in silico* de bancos de dados genômicos e transcritômicos, uma nova defensina de ostras, denominada *Cga-Def*, foi identificada e classificada no subgrupo *arthropod-like*. A análise bioinformática da sequência precursora deduzida revelou a presença de um peptídeo sinal, seguido por um pró-domínio e de peptídeo maduro cationicamente carregado, com massa molecular de 4,46 kDa. A modelagem da estrutura terciária confirmou uma conformação tridimensional conservada, do tipo  $CS\alpha\beta$ , estabilizada por três ligações dissulfeto, típica das defensinas de invertebrados. A descoberta da *Cga-Def* contribui para o entendimento da imunidade inata em bivalves e oferece uma base molecular para futuras investigações sobre seu potencial biotecnológico como agente antimicrobiano alternativo.

**Palavras-chave:** peptídeos antimicrobianos, moluscos bivalves, imunologia, bioinformática.

## ABSTRACT

The native oyster *Crassostrea gasar* holds significant economic relevance for national aquaculture, ranking second in production in the country. Because they act as filter feeders, these mollusks are permanently exposed to a variety of microorganisms, including pathogenic agents. To combat these threats, oysters developed an efficient innate immune system, which relies on the action of antimicrobial peptides (AMPs). Invertebrate defensins represent a prominent class of AMPs, categorized into two main phylogenetic subgroups based on their molecular signatures: "mollusk-like" (characteristic of mollusks) and "arthropod-like" (characteristic of arthropods). This study aimed to identify and characterize at the molecular level a novel oyster defensin from *C. gasar*. Through an *in silico* mining approach of genomic and transcriptomic databases, a novel gene encoding a defensin, named *Cga-Def*, was identified and classified into the "arthropod-like" subgroup. A bioinformatic analysis of the deduced precursor sequence revealed the presence of a signal peptide, followed by a pro-domain and a cationically charged mature peptide with a predicted molecular mass of 4.46 kDa. Modeling of the tertiary structure confirmed a conserved three-dimensional conformation, of the CS $\alpha$  $\beta$  type, stabilized by three disulfide bridges, typical of invertebrate defensins. The discovery of *Cga-Def* contributes to the understanding of bivalve innate immunity and provides a molecular basis for future studies exploring its biotechnological potential as an alternative antimicrobial agent.

**Keywords:** antimicrobial peptides; bivalve mollusks; immunology; bioinformatics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática sem escala das respostas imunes de hemócitos de ostras. ....	12
Figura 2. Estruturas terciárias de defensinas do tipo <i>Csαβ</i> . ....	17
Figura 3. Fluxograma das buscas <i>in silico</i> . ....	21
Figura 4. Fluxograma da caracterização molecular <i>in silico</i> . ....	22
Figura 5. Estrutura do precursor, sequência nucleotídica e aminoacídica da nova defensina de <i>C. gasar</i> . ....	24
Figura 6. Alinhamento aminoacídico das defensinas do tipo <i>Csαβ</i> em moluscos e insetos. ....	25
Figura 7. Predição tridimensional de <i>Cga-Def</i> . ....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	peptídeos antimicrobianos
BigDefs	big-defensinas
BPI	proteínas indutoras de permeabilidade bacteriana
CDD	busca de domínio conservados
CDS	região codificante
<i>Cga-Def</i>	defensina da ostra <i>Crassostrea gasar</i>
<i>Cg-Defm</i>	defensina do manto de <i>Crassostrea gigas</i>
<i>Cg-Defh</i>	defensinas de hemócitos de <i>Crassostrea gigas</i>
CNV	variação do número de cópias gênicas
CS $\alpha\beta$	motivo alfa-beta estabilizado por cisteínas
DAMPs	padrões moleculares associados a danos
Defs	defensinas
FAO	organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura
kDa	quilo-daltons
LPS	lipopolissacarídeo
MAMPs	padrões moleculares associados a microrganismos
MGD-1	<i>Mitylus galoproviciallis</i>
MM	massa molecular
MMV	mortalidade em massa de verão
NCBI	biblioteca nacional de medicina
OsHV-1	herpes vírus de ostras
OsHV-1 $\mu$ Var	variante da herpes vírus de ostras
Pb	pares de base
PDB	banco de dados de proteína
Prp	peptídeos ricos em resíduos de prolina ou arginina
PRPs	proteínas de reconhecimento de padrões
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões
<i>Pv-Def</i>	<i>Perna viridis-defensin</i>
pI	ponto isoelétrico teórico
ROS	espécies reativas de oxigênio
TSA	montagem de transcriptoma shotgun
WOAH	organização mundial da saúde animal

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	13
1.2	DEFENSINAS.....	14
1.3	DEFENSINAS DO TIPO CS ALFA BETA.....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1	GERAL .....	19
2.2	ESPECÍFICOS.....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1	BUSCAS <i>IN SILICO</i> .....	20
3.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	21
3.3	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL .....	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
4.1	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	23
4.2	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL .....	25
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>29</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A ostreicultura é uma atividade essencial e estratégica para a segurança alimentar global, contribuindo significativamente para o fornecimento de proteína animal de alta qualidade e para a geração de renda e sustento em comunidades costeiras (FAO, 2022). No Brasil, a produção de ostras resultou em uma produção de acima de 10 mil toneladas em 2020 (FAO, 2022), sendo o Estado de Santa Catarina responsável por 98% da produção nacional (FAO, 2022). Entre as espécies mais produzidas no país estão a ostra-do-pacífico *Magallana gigas* e a ostra nativa *Crassostrea gasar* (Brasil, 2023). A ostra *C. gasar* é um molusco bivalve (família Ostreidae) com grande importância ecológica e econômica para o Brasil, especialmente em regiões estuarinas e de manguezais (FAO, 2022).

Por serem organismos sésseis e filtradores, as ostras estão constantemente expostas a uma grande diversidade de microrganismos potencialmente patogênicos presentes no ambiente aquático. Essa exposição permanente representa um desafio imunológico contínuo e pode resultar em severas perdas econômicas, como no fenômeno de Mortalidade em Massa de Verão (MMV) em Santa Catarina. Esse fenômeno, associado a estresses fisiológicos e térmicos, causou mortalidades superiores a 89% em *M. gigas* a partir de 1987 e foi posteriormente agravado pela ação de patógenos específicos (Silveira Jr *et al.*, 1997).

O cultivo global de ostras tem enfrentado surtos sazonais de mortalidade associados principalmente a agentes infecciosos como o vírus *OsHV-1* e sua variante mais agressiva ( $\mu$ Var), que afetaram a Europa, Ásia, Oceania e, mais recentemente, a Argentina e o Brasil, impactando tanto *M. gigas* quanto *C. gasar* (Mello *et al.*, 2018; Suplicy *et al.*, 2022). Além dos vírus, protozoários do gênero *Perkinsus* e bactérias do gênero *Vibrio* representam ameaças significativas, sendo a presença de *Perkinsus spp.* em *C. gasar* de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (Da Silva *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2020).

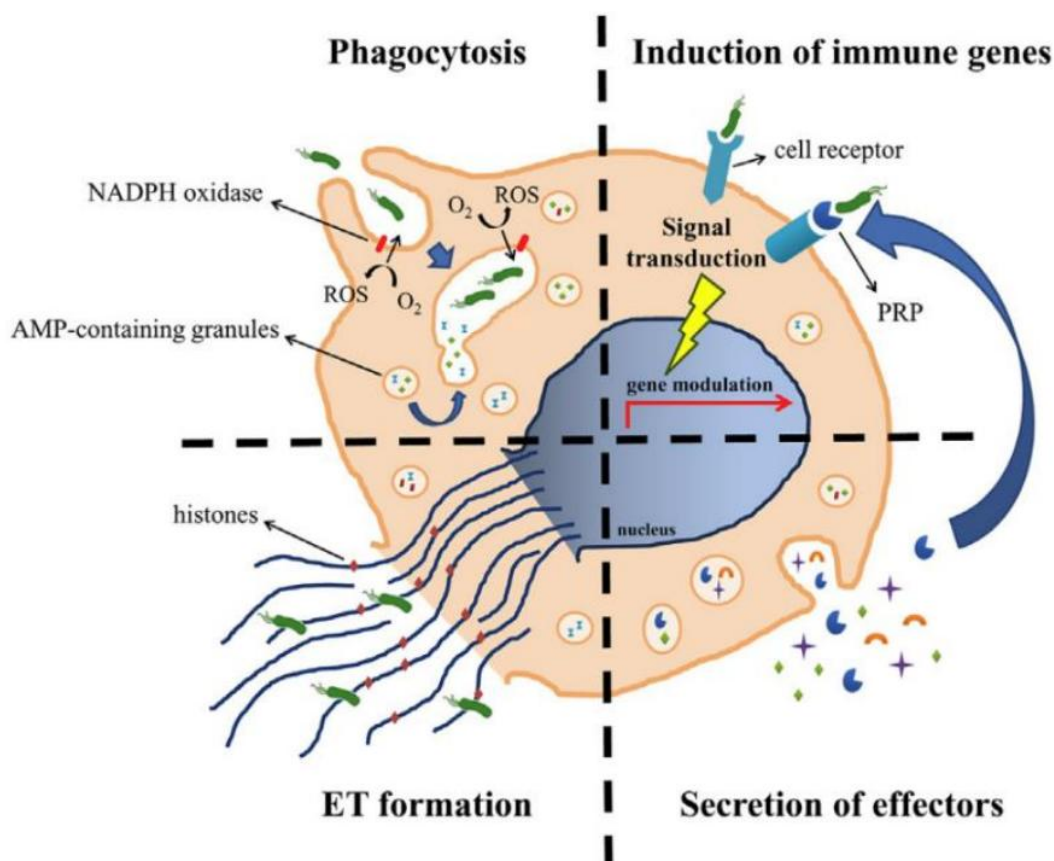
Para enfrentar essa constante pressão patogênica, as ostras desenvolveram um sistema imunológico inato eficiente e variados mecanismos de defesa. A primeira linha de defesa é física, constituída pela concha (Hanan Al-khalalfah *et al.*, 2022). Ao

ultrapassar essa barreira, os microrganismos são confrontados por respostas imunes celulares e humorais especializadas.

O sistema imunológico dos moluscos opera por meio de hemócitos (células imunocompetentes circulantes) e moléculas efetoras presentes na hemolinfa, em um sistema de circulação semiaberto, que permite a infiltração celular nos tecidos (Cheng, 1996). Os mecanismos de defesa incluem: (i) o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (MAMPs) e a danos (DAMPs); (ii) a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS); (iii) respostas celulares como fagocitose e encapsulamento; e (iv) a liberação de uma ampla gama de peptídeos antimicrobianos (AMPs), ilustrados na Figura 1 (Wu *et al.*, 2021).

Com base em diferentes critérios (morfotipos, ultraestrutura, características físico-químicas, funções biológicas), os hemócitos foram classificados em dois tipos principais de células: células granulares e agranulares, que são subdivididos em vários subgrupos (Cheg *et al.*, 1981; Freire *et al.*, 2023). Atualmente, uma descrição mais detalhada descreve sete morfotipos de hemócitos, sendo três agranulares (hialinócitos, blastos basofílicos e blastos acidofílicos) e quatro granulares (células semelhantes a macrófagos, células com pequenos grânulos, células com grandes grânulos e células vesiculares (De La Forest Divonne *et al.*, 2025). A diversidade e eficiência desses mecanismos são cruciais para que as ostras diferenciem microrganismos patogênicos dos comensais, mantenham a homeostase e garantam sua sobrevivência em ambientes microbiologicamente desafiadores.

**Figura 1.** Representação esquemática sem escala das respostas imunes de hemócitos de ostras.



Fagocitose: os microrganismos são fagocitados após serem reconhecidos e podem ser destruídos por (i) espécies reativas de oxigênio através do complexo NADPH oxidase e/ou (ii) moléculas de defesa (peptídeos antimicrobianos, enzimas hidrolíticas e outros efetores) armazenadas em grânulos que se fundem com o fagossomo; Formação de armadilhas extracelulares: após a exposição a microrganismos ou danos teciduais, os hemócitos liberam armadilhas extracelulares (ETs) de DNA associado a histonas, imobilizando o microrganismo juntamente a outros efetores imunes; Secreção de efetores: os efetores imunes podem ser armazenados em grânulos ou vesículas citoplasmáticas e liberados no plasma ou nas cavidades do corpo da ostra de forma constitutiva ou induzida por fatores bióticos e abióticos. Indução de genes imunológicos: os hemócitos podem ser ativados por vários mecanismos, incluindo danos teciduais, estresse e reconhecimento microbiano por proteínas/receptores de reconhecimento de padrões (PRPs) solúveis e celulares, levando à indução da expressão de genes imunológicos (ADAPTADO DE Bachère *et al.*, 2015).

## 1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os AMPs são moléculas presentes em praticamente todos os seres vivos, sendo considerados efetores de defesa evolutivamente conservados (Wu *et al.*, 2021). Eles são classicamente descritos como moléculas anfipáticas e catiônicas, com massa molecular de até 10 kDa, possuindo uma região hidrofílica rica em aminoácidos carregados positivamente e uma região hidrofóbica (Brogden *et al.*, 2005; Kohebach *et al.*, 2019). O marco inicial da pesquisa sobre AMPs em moluscos bivalves ocorreu em meados da década de 1990, quando o primeiro AMP foi isolado da hemolinfa de mexilhões do gênero *Mytilus* por abordagens bioquímicas clássicas e nomeado *Mytilus galloprovincialis defensin 1* (MGD-1) (Hubert *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2000).

Classicamente, os AMPs interagem diretamente com a membrana celular dos microrganismos por meio de interações eletrostáticas entre sua região catiônica e a porção aniônica dos fosfolipídios microbianos. Essa interação permite a inserção da região hidrofóbica do peptídeo na membrana, causando desestabilização ou formação de poros, o que resulta no extravasamento do conteúdo intracelular. Outros AMPs podem ser internalizados e se ligar a biomoléculas como DNA, RNA ou proteínas, ou ainda inibir vias metabólicas essenciais do microrganismo. Eles também podem desempenhar outras funções biológicas, como cicatrização, modulação de efetores imunológico e indução de respostas pró-inflamatórias (Brogden *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2019).

Apesar da grande diversidade em termos de tamanho, estrutura primária, composição aminoacídica e modo de ação dos AMPs, na maioria dos casos, o caráter anfipático é considerado crucial para a interação do peptídeo efetivo com a membrana de microrganismos. Essa interação ocorre: (i) pela perturbação de suas membranas citoplasmáticas negativamente carregadas ou (ii) pela eliminação após translocação para dentro das bactérias sem lise da membrana (Schmitt *et al.*, 2012). Essa diversidade de mecanismos reduz a susceptibilidade do surgimento da resistência bacteriana, tornando os alvos candidatos promissores para o desenvolvimento de novos antibióticos de origem natural por meio de biotecnologia (Wu *et al.*, 2021).

Nas ostras, foram descritas quatro principais famílias de AMPs: (i) defensinas (Defs), big defensinas (BigDefs), peptídeos ricos em resíduos de prolina e arginina (Prp) e proteínas indutoras de permeabilidade bacteriana (BPI). As defensinas foram os primeiros AMPs identificados em ostras, sendo os mais estudados e conhecidos (Gueguen *et al.*, 2006).

As Prps compõem uma família multigênica e hemocitária, a qual foi inicialmente identificada na ostra *M. gigas* por abordagens *in silico*, sendo exclusivos de ostras. Esses peptídeos anfipáticos são caracterizados por possuírem uma região central catiônica, rica em resíduos de prolina e arginina, seguida de uma cauda carboxi-terminal aniônica (Schmitt *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2012).

As BPIs compõem uma família envolvida na defesa contra bactérias Gram-negativas por meio da ligação ao LPS (componente lipídico tóxico da membrana externa desses microrganismos) e promove a desestabilização da membrana externa de bactérias Gram-negativas e levando à lise celular. Elas são codificadas por genes que formam uma família multigênica e exibem expressão constitutiva em tecidos epiteliais, como manto, brânquias e trato digestivo. Além disso, essa família parece estar envolvida na participação da fagocitose (Mao *et al.*, 2013).

As Big defensinas são ancestrais das trans-defensinas de vertebrados, inicialmente identificadas em hemócitos de quelicerados marinhos. São sintetizadas contendo um peptídeo sinal, um pró-domínio e um peptídeo maduro de ~10 kDa com dois domínios funcionais: um domínio amino-terminal hidrofóbico (com conformação  $\beta 1-\alpha 1-\alpha 2-\beta 2$ ) e um domínio carboxi-terminal com a típica estrutura de  $\beta$ -defensinas, estabilizado por três ligações dissulfeto. Em bivalves, seus genes formam famílias multigênicas sujeitas à variação de presença/ausência (PAV) e apresentam expressão diferencial e regulada (ex.: indução por patógenos via NF- $\kappa$ B). Sua atividade antimicrobiana é sinérgica: o domínio N-terminal promove o aprisionamento de patógenos em nanorredes, enquanto o domínio C-terminal exerce a ação microbicida direta, além de poder modular a microbiota do hospedeiro.

## 1.2 DEFENSINAS

As defensinas compreendem uma das famílias de AMPs mais abundantes e amplamente estudadas, já identificadas em fungos, plantas e animais vertebrados e invertebrados (Schmitt *et al.*, 2012). Geralmente são AMPs catiônicos e anfipáticos, que contêm de seis a oito resíduos de cisteínas, formando de três a seis ligações dissulfeto que estabilizam a sua conformação tridimensional.

Estudos filogenéticos classificaram as defensinas em duas superfamílias análogas, denominadas *cis*-defensinas e *trans*-defensinas. Essa classificação baseia-se no espaçamento e pareamento dos resíduos de cisteína e na orientação da estrutura secundária do peptídeo. No entanto, essas superfamílias são de origens diferentes que convergiram evolutivamente suas estruturas e funções, não apresentando correlação filogenética (Gerdol *et al.*, 2020; Shafee *et al.*, 2016).

Descoberta inicialmente em granulócitos de coelhos, a primeira defensina mostrou-se ativa contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A designação "defensina" originou-se justamente do papel crucial desempenhado por esses peptídeos na defesa do hospedeiro contra patógenos (Selsted *et al.*, 1984). Pesquisas subsequentes que buscaram por defensinas em outras espécies destacaram a relevância dessas proteínas para a imunidade, especialmente em organismos que carecem de um sistema imune adaptativo (Defer *et al.*, 2013).

Um exemplo representativo é o das ostras, moluscos sésseis e osmoconformes que, habitando em ambientes marinhos repleto de microrganismos, desenvolveram eficientes mecanismos de defesa. Uma de suas principais estratégias é a produção de uma diversidade de AMPs (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2016).

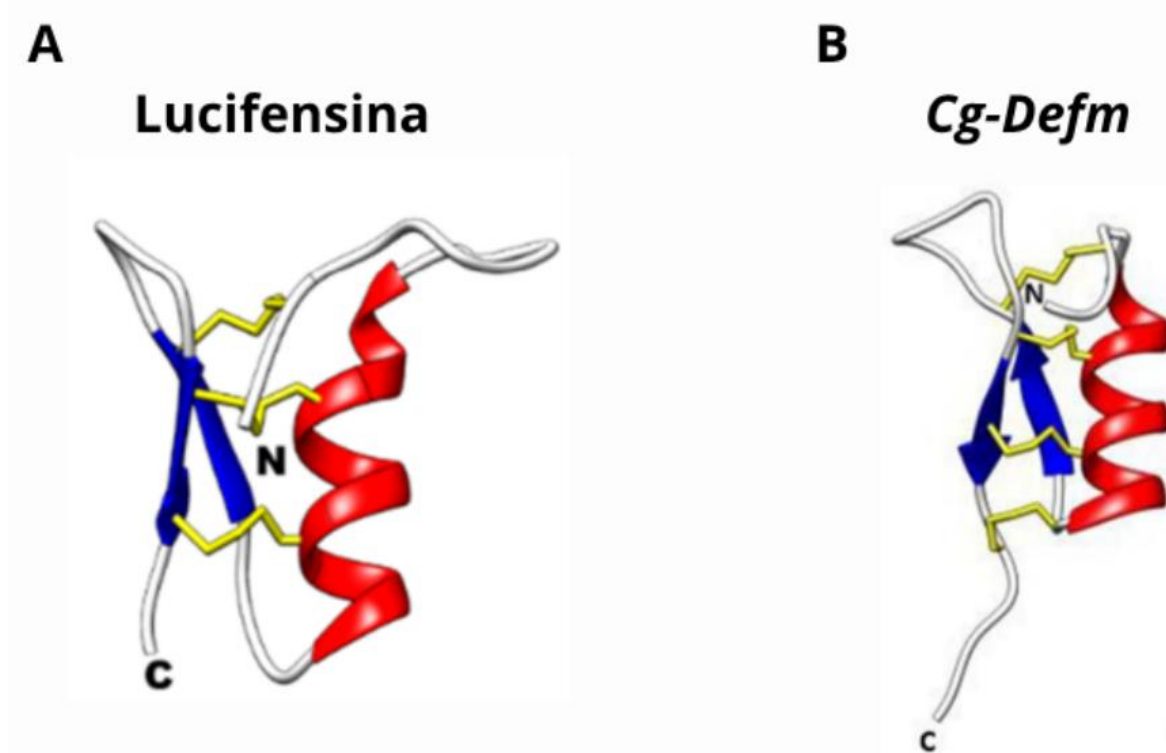
As primeiras defensinas de ostras foram caracterizados no manto (*Cg-Defm*) e nos hemócitos (*Cg-Defh1* e *Cg-Defh2*) (Gueguen *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007). Seu mecanismo de ação consiste no aprisionamento e sequestro do lipídio II extracelular, bloqueando assim sua polimerização em peptidoglicano maduro (Schmitt, *et al.*, 2010). Em procaríotos, as defensinas interferem também no fluxo de íons e na síntese da parede celular.

### 1.3 DEFENSINAS DO TIPO CS ALFA BETA

As defensinas do tipo CS $\alpha\beta$  (*cysteine-stabilized  $\alpha$ -helix  $\beta$ -sheet motif*) são os representantes da *cis*-defensinas, o grupo mais diverso e bem distribuído de AMPs. Essas defensinas possuem estrutura secundária composta por uma  $\alpha$ -hélice e duas folhas- $\beta$  antiparalelas, estabilizadas por três (Cys<sub>1-4</sub>Cys<sub>2-5</sub>Cys<sub>3-6</sub>) ou quatro (Cys<sub>1-5</sub>Cys<sub>2-6</sub>Cys<sub>3-7</sub>Cys<sub>4-8</sub>) ligações dissulfeto (Schmitt *et al.*, 2016) (**Figura 2**). Esse dobramento constitui o elemento chave da estrutura tridimensional conhecida como motivo  $\alpha$ -hélice/folha  $\beta$  estabilizado por cisteína (CS $\alpha\beta$ ), compartilhado por todas as *cis*-defensinas (Schmitt *et al.*, 2016; Shafee *et al.*, 2016). As defensinas do tipo CS $\alpha\beta$  exibem uma ampla variedade de assinaturas moleculares e padrões de pareamentos entre as cisteínas, que estão presentes em diversos táxons, incluindo moluscos, artrópodes, nematoides, fungos e plantas (Shafee *et al.*, 2017).

Filogeneticamente, essas defensinas, em moluscos bivalves, agrupam-se em dois principais grupos: "*mollusk-like*" e "*arthropod-like*". As defensinas *mollusk-like* possuem uma assinatura molecular clássica de defensinas identificadas em moluscos (*ancient invertebrate-type defensins* ou AITDs). Essa assinatura conservada é devido aos resíduos de Gly-Phe-Gly-Cys (GFGC) na região N-terminal. As defensinas *arthropod-like* possuem uma assinatura homóloga às defensinas classicamente descritas em insetos (*classical insect-type defensins* ou CITDs). Essa assinatura conservada é devido aos resíduos de Ala-Thr-Cys-Asp-Leu (ATCDL) na região N-terminal (Zhu *et al.*, 2008). As defensinas *arthropod-like* apresentam seis resíduos de cisteínas e são compostas por um peptídeo sinal, pró-domínio e peptídeo maduro. Já as defensinas *mollusk-like* podem apresentar seis ou oito resíduos de cisteína e apenas um peptídeo sinal seguido do peptídeo maduro. Algumas espécies de molusco podem conter tanto as defensinas *mollusk-like* quanto as *arthropod-like*. Estudos sugerem ainda que ambos os grupos possuem atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Bulet *et al.*, 2004; Gueguen *et al.*, 2006).

**Figura 2.** Estruturas terciárias de defensinas do tipo *Csaβ*.



Defensinas contendo três ou quatro ligações dissulfeto unidas por seis a oito resíduos aminoacídicos de cisteínas, respectivamente. As sequências aminoacídicas em  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$  e *coil* estão representadas em vermelho, azul e cinza, respectivamente, enquanto as ligações dissulfeto estão representadas em amarelo. (A) A estrutura terciária da defensina Lucifensina (do inseto *Lucilia sericata*), do tipo *arthropod-like* com seis resíduos aminoacídicos de cisteínas e três ligações dissulfeto. (B) defensina *Cg-Defm* (*Magallana gigas*), do tipo *mollusk-like* com oito resíduos aminoacídicos de cisteínas e quatro ligações dissulfeto. Cys = resíduo de cisteína (Adaptado de Rocha, 2020).

O primeiro registro de defensinas *mollusk-like* ocorreu no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, sendo nomeada MGD-1 (*Mytilus galloprovincialis defensin*). Sua identificação iniciou as buscas por defensinas *mollusk-like* em outras espécies e organismos, incluindo as ostras. A MGD-1 é composta por oito resíduos de cisteínas e quatro ligações dissulfeto (assinatura 'GFGC') (Charlet *et al.*, 1996; Hubert *et al.*, 1996). As defensinas *arthropod-like* também foram identificadas em moluscos, como no mexilhão *Perna viridis*. Esta defensina (*Pv-Def*) tem organização gênica composta de três éxons e dois introns, com um peptídeo sinal de 19 aminoácidos e um peptídeo maduro de 45 aminoácidos. A expressão de *Pv-Def* é elevada no hepatopâncreas e aumenta com desafio bacteriano por *Vibrio parahaemolyticus* (Wang *et al.*, 2018).

Nesse contexto, os AMPs destacam-se como componentes-chave da imunidade humoral, atuando como antibióticos naturais de amplo espectro. Entre as

famílias de AMPs em ostras, as defensinas do tipo  $CS\alpha\beta$  são particularmente importantes. Estudos revelaram a existência de dois subgrupos filogenéticos principais: “*mollusk-like*” e “*arthropod-like*”, com distintas assinaturas moleculares e padrões estruturais (Zhu *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016).

Entretanto, há uma lacuna significativa de conhecimento quanto à diversidade e características dessas moléculas em espécies nativas de interesse econômico. Especificamente em *Crassostrea gasar*, segunda em produção no país, não há qualquer registro de defensina caracterizada, o que limita a compreensão dos seus mecanismos de defesa e o desenvolvimento de potenciais aplicações biotecnológicas baseadas em sua imunidade.

Hipotetiza-se, então, que no genoma da ostra nativa *C. gasar* existam genes codificadores de defensinas do tipo  $CS\alpha\beta$ . Portanto, este estudo visou empregar ferramentas computacionais para identificar e caracterizar molecularmente uma nova defensina nesta espécie, gerando conhecimento fundamental sobre sua imunidade inata e fornecendo uma base molecular para futuras investigações sobre seu potencial como agente antimicrobiano alternativo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Identificar e caracterizar *in silico*, de forma estrutural, genes codificantes de defensina do tipo  $CS\alpha\beta$  na ostra nativa *Crassostrea gasar*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Buscar defensinas do tipo  $CS\alpha\beta$  em bancos transcritômicos e genômicos de *C. gasar*;
- Analisar as propriedades estruturais e bioquímicas;
- Predizer a estrutura tridimensional da defensina de *C. gasar*.

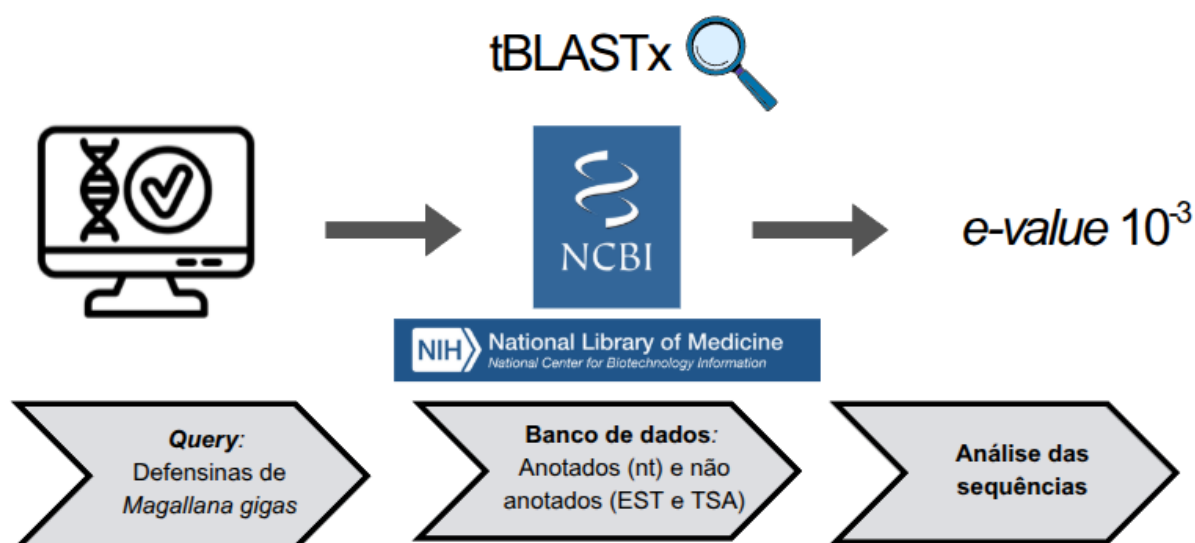
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 BUSCAS *IN SILICO*

As sequências nucleotídicas codificantes de potenciais defensinas *mollusk-like* (GenBank: CP048842.1) e *arthropod-like* (GenBank: AFTI02000011.1) de *M. gigas* (por ser a espécie modelo de estudos em ostras) foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) para a busca de sequências homólogas em *C. gasar*. As buscas foram realizadas no repositório público *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) por meio da ferramenta tBLASTx. Os bancos de dados utilizados na prospecção foram os anotados (*Nucleotide and Protein Collection*) e não anotados (*Expressed sequence Tags* e *Transcriptome Shotgun Assembly*). Nessa busca, foram desconsideradas sequências com porcentagem de identidade inferior a 30% e coeficientes de confiabilidade (*e-value*) superiores a  $10^{-3}$ . O índice baixo de confiabilidade foi utilizado como estratégia para obter o máximo de correspondência abrangente na minha saída (*output*), uma vez que busca-se novos “tipos” de defensinas; ao contrário, por exemplo, de uma busca por região altamente conservada e já bem descrita.

As sequências foram traduzidas por meio do programa *ExPASy Translate Tool* (<https://web.expasy.org/translate/>) para a obtenção das sequências aminoacídicas. As sequências obtidas foram conferidas manualmente e apenas a sequência completa foi considerada para análises subsequentes. A sequência aminoacídica deduzida encontrada em *C. gasar* foi alinhada com sequências semelhantes a defensinas *mollusk-like* e *arthropod-like* de insetos e de outras espécies de ostras encontradas nessa mesma busca. As espécies utilizadas, assim como seus códigos de identificação estão disponíveis no **Apêndice A**. Foi utilizando o programa *MAFFT version 7* (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) visando identificar resíduos conservados. A visualização e análise do alinhamento foi feita pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2* (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>). O fluxograma está ilustrado na **Figura 3**.

**Figura 3.** Fluxograma das buscas *in silico*.

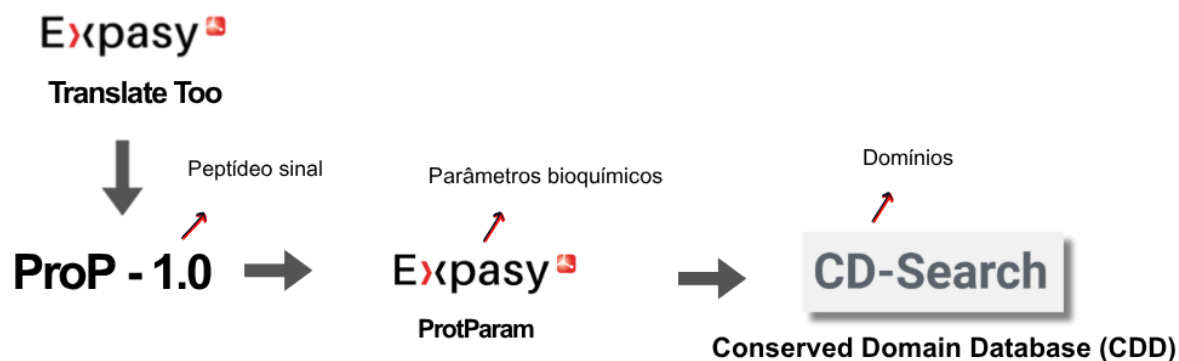


Estrutura esquemática para fins didáticos por meio de fluxograma da sequência de métodos e ferramentas utilizadas. A função tBLASTx busca por sequências de nucleotídeos (input) semelhantes à consulta com base em seu potencial de codificação de outro nucleotídeo (output). Inicia-se com uma sequência de entrada em bancos de dados, seguido de filtragem e análise das sequências promissoras.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Para prever a existência de peptídeo sinal e pró-domínios da sequência resgatada, foi utilizado programa *ProP 1.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>). As propriedades bioquímicas do peptídeo maduro, como massa molecular (MM) (em kDa) e ponto isoelétrico teórico (pI), foram previstas utilizando o programa *Expasy ProtParam Tool* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Para a identificação de domínios proteicos conservados, foi utilizado a ferramenta *Conserved Domain Database (CDD)* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

**Figura 4.** Fluxograma da caracterização molecular *in silico*.



Estrutura esquemática para fins didáticos por meio de fluxograma. Os nomes entre as setas representam as ferramentas de bioinformática utilizados na caracterização.

### 3.3 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

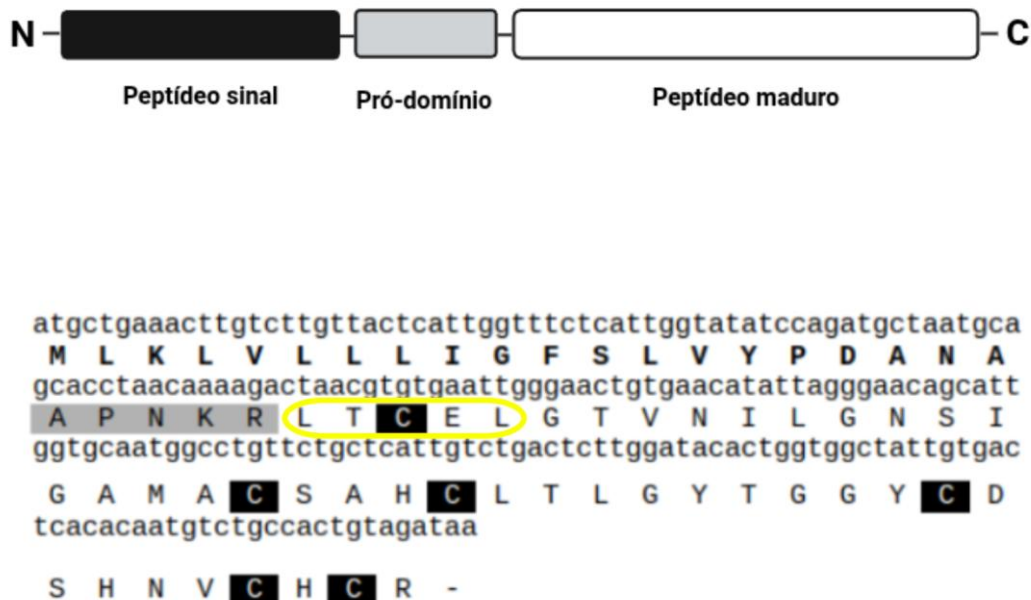
A predição da estrutura tridimensional de *Cga-Def* foi realizada no programa *SWISS-MODEL* (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). O molde utilizado para a predição tridimensional foi o da defensina *arthropod-like* da mosca *Protophormia terraenovae* (Phormicin; PDB: 1ICA). Embora a identidade de sequência possa ser considerada baixa (abaixo dos 70% usualmente requeridos), a alta similaridade em categorias de aminoácidos e a conservação do padrão de cisteínas e ligações de sulfeto que as estabilizam tornaram o molde adequado para manter a estrutura tridimensional. Ao contrário de defensinas de espécies modelo, como a *M. gigas*, que tem apenas defensinas *mollusk-like* com um padrão distinto de oito resíduos de cisteínas estabilizados por quatro ligações dissulfeto. A estrutura foi analisada e editada por meio do programa *Pymol* (<https://www.pymol.org/>) (Schrodinger *et al.*, 2015).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

As buscas *in silico* de sequências codificantes de novas defensinas em *C. gasar* resultaram na identificação de uma sequência *arthropod-like* (GenBank: GJZE01003071). A sequência foi obtida no banco de dados TSA (*Transcriptome Shotgun Assembly*), retirados de sequenciamento dos tecidos de brânquias e glândula digestiva de *Crassostrea gasar* expostas a contaminantes ambientais. Essa sequência nucleotídica contém uma CDS (sequência codificante) de 207 pb que codifica um precursor de 67 resíduos aminoacídicos. As análises das predições bioquímicas *in silico* mostraram que o precursor aminoacídico é composto por um peptídeo sinal de 19 resíduos, seguido de um pró-domínio de cinco resíduos (APNKR) (**Figura 5**). Foi identificado também um Domínio cl41745 - DEFL Superfamily, que caracteriza o arcabouço da estrutura alfa/beta estabilizado por cisteína. Os resultados também revelaram que o pró-domínio dessa sequência possui o sítio de clivagem dibásico (Lys-Arg). O peptídeo maduro possui 43 resíduos, massa molecular deduzida de 4,46 kDa e ponto isoelétrico teórico (pI) de 6,25. Também foi identificada uma assinatura molecular conservada de seis resíduos de cisteínas Cys-X7-16-Cys-X3-Cys-X9-Cys-X5-Cys-X1-Cys, semelhante às defensinas do tipo  $CS\alpha\beta$  – “*arthropod-like*”. Considerando essa assinatura molecular *arthropod-like*, essa defensina do tipo  $CS\alpha\beta$  foi designada como *Cga-Def* (*Crassostrea gasar defensin*).

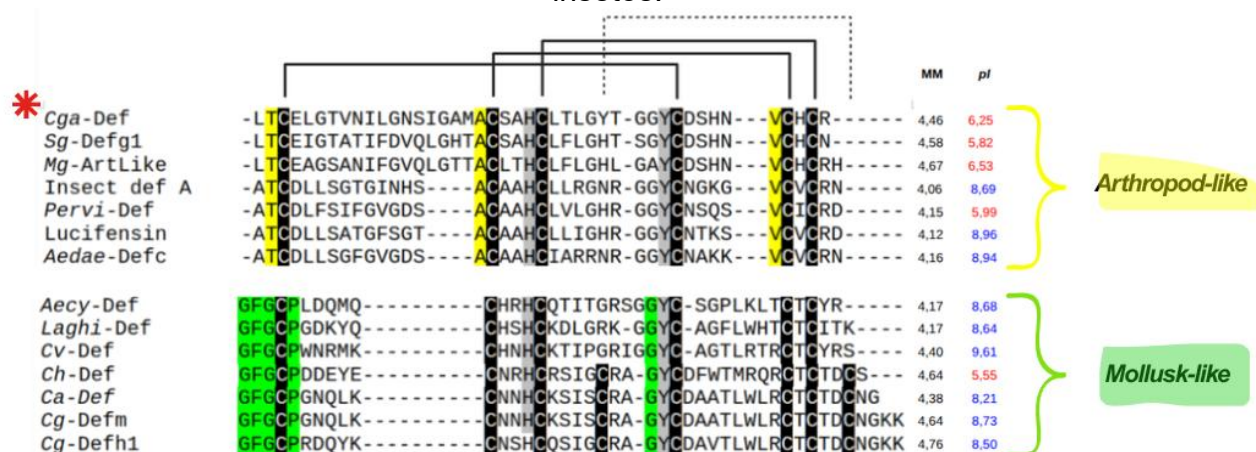
**Figura 5.** Estrutura do precursor, sequência nucleotídica e aminoacídica da nova defensina de *C. gasar*.



(A) Esquema ilustrativo do precursor da *Cga-Def*. As letras “N” e “C” representam a porção N-terminal e C-terminal do peptídeo, respectivamente. O retângulo preto representa a região do peptídeo sinal, em cinza a região do pró-domínio, e em branco, a região do peptídeo maduro. (B) Sequência nucleotídica e aminoacídica deduzida da defensina *Cga-Def*. As sequências aminoacídicas foram representadas em letras maiúsculas, enquanto as sequências nucleotídicas, em letras minúsculas. O peptídeo sinal está em negrito, o pró-domínio está sombreado em cinza e os resíduos conservados de cisteína estão destacados em preto. O padrão aminoacídico de *arthropod-like* (LTCEL) está destacado em amarelo. O traço indica o códon de parada.

Para identificar a semelhança entre sequências de defensinas do tipo  $CS\alpha\beta$ , foi feito um alinhamento múltiplo utilizando outras defensinas previamente descritas e caracterizadas, dos tipos “*arthropod-like*” e “*mollusk-like*” de outras espécies (ostras e insetos). A análise do alinhamento revelou uma similaridade maior com as defensinas “*arthropod-like*” (**Figura 6**). Nesse alinhamento é possível observar também a diferença de assinatura molecular entre os dois tipos de defensinas do tipo  $CS\alpha\beta$ , onde as defensinas *arthropod-like* possuem seis resíduos de cisteínas conservados, estabilizadas por três ligações dissulfeto (Cys<sub>1-4</sub>Cys<sub>2-5</sub>Cys<sub>3-6</sub>), confirmando novamente a semelhança de *Cga-Def*. Além disso, as características bioquímicas indicam que a massa molecular de *Cga-Def* é semelhante às demais defensinas do mesmo tipo (3,5-4,5 kDa). O alinhamento permitiu a separação clara em dois grupos de defensinas, embora apresentem assinaturas moleculares distintas, mantêm o posicionamento e pareamento entre cisteínas conservados entre as sequências (**Figura 6**).

**Figura 6.** Alinhamento aminoacídico das defensinas do tipo *Csaβ* em moluscos e insetos.

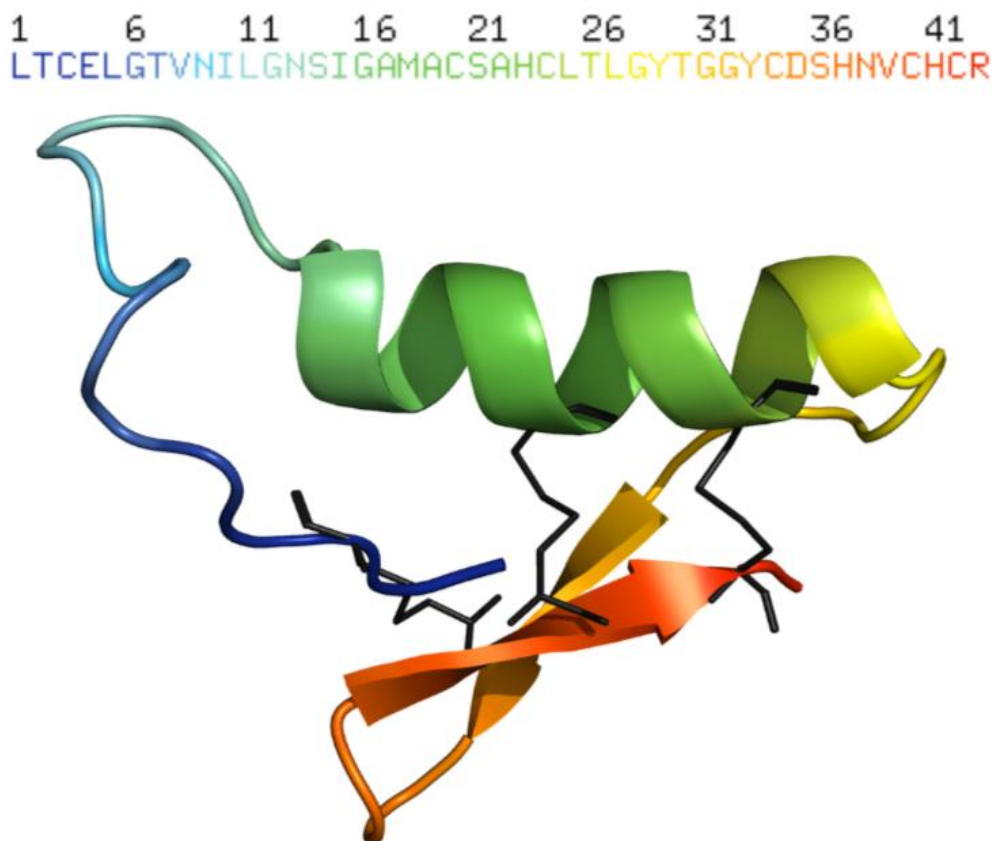


Os resíduos aminoacídicos conservados entre todas as sequências estão destacados em cinza, enquanto os resíduos aminoacídicos conservados apenas em defensinas *arthropod-like* e *mollusk-like* estão destacados em amarelo e verde, respectivamente. O asterisco vermelho indica a sequência encontrada. Os resíduos de cisteína estão destacados em preto. As barras acima das sequências correspondem à posição das ligações dissulfeto e a barra serrilhada corresponde à ponte dissulfeto adicional de sequências contendo oito resíduos de cisteína de algumas defensinas *mollusk-like*. A massa molecular (MM) em quilodaltons (kDa) e o ponto isoelétrico teórico (*pI*) estão apresentados ao lado direito do alinhamento. Os valores de *pI* das defensinas com caráter catiônico e aniônico estão destacados em azul e vermelho, respectivamente. O código alfanumérico de acesso da sequência no banco de dados (GenBank), assim como o nome das respectivas espécies mostradas no alinhamento estão descritos no **Apêndice A**.

## 4.2 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

A análise da estrutura tridimensional de *Cga-Def* demonstrou alta semelhança com o modelo proteico de defensinas *arthropod-like*. A defensina *Cga-Def* possui uma estrutura com a presença de uma  $\alpha$ -hélice na porção N-terminal e duas folhas- $\beta$  antiparalelas na porção C-terminal, estabilizadas por três ligações dissulfeto (**Figura 7**), que também é observada em defensinas *arthropod-like*.

**Figura 7.** Predição tridimensional de *Cga-Def*.



Estrutura tridimensional da nova defensina *Cga-Def*. No canto esquerdo superior da imagem há a representação das cores da estrutura da molécula de acordo com sequência aminoacídica do peptídeo. A estrutura espiral em verde representa uma  $\alpha$ -hélice, enquanto as duas folhas- $\beta$  estão em laranja e vermelho. As linhas pretas representam as três ligações dissulfeto realizadas pelos seis resíduos aminoacídicos de cisteína presentes.

## 5 DISCUSSÃO

Peptídeos antimicrobianos são moléculas efetoras do sistema imune inato presente em diversos organismos, incluindo as ostras. Os estudos para a identificação e caracterização dessas moléculas são amplamente conhecidos e demonstrados na espécie modelo da família Ostreidae, *M. gigas*, porém ainda escassos em espécies brasileira, como a *C. gasar*. As defensinas *CS $\alpha$  $\beta$  arthropod-like* haviam sido anteriormente caracterizadas em mexilhões (Wang *et al.*, 2018). Entretanto, ainda não há defensinas *arthropod-like* em ostras descritas na literatura. Dessa forma, o presente estudo amplia o conhecimento acerca dos AMPs em ostras, pela identificação de uma defensina em *C. gasar* (*Cga-Def*).

A Cga-Def foi encontrada nos transcritos de *Crassostrea tulipa*, que eram da mesma espécie, inicialmente foi definido por Lamarck em 1819 como *C. tulipa* (Worms: 506706). Posteriormente, *Crassostrea gasar* (Worms: 532678) foi intitulada por Dautzenberg em 1891, como sinônimo de *Crassostrea tulipa*. Estudos mais recentes têm reconhecido a presença de duas espécies na zona litorânea: *C. rhizophorae* e *C. gasar*. No entanto, ainda se utilizam outros nomes, como *C. brasiliiana* ou *C. tulipa* para *C. gasar*, por meio do rastreamento molecular de espécimes cultivados, juntamente com espécimes silvestres de *Crassostrea* coletados no litoral brasileiro. Os espécimes selvagens foram identificados provisoriamente como *C. gasar* com base em revisões morfológicas anteriores.

Avaliações conquiológicas e anatômicas de espécimes identificados de *Crassostrea* confirmaram o polimorfismo inerente entre as espécies nativas, impedindo a identificação confiável das espécies apenas pela morfologia. Uma exceção clara, no entanto, foi encontrada em indivíduos com concha superior a 110 mm, com vista interna de valvas de coloração branca e sem cavidade umbonal, correspondendo à descrição de *C. gasar*. Concluiu-se, então, que *C. tulipa* representa uma espécie não relacionada a nenhuma espécie de ostra de mangue descrita nos mares do Atlântico (Bouchet *et al.*, 2024). Isto abre ainda mais perspectivas de buscas por novos AMPs no genoma dessas espécies.

A identificação de um Domínio Conservado cl41745 - DEFL Superfamily caracterizou o arcabouço da estrutura alfa/beta estabilizado por cisteína. A defensina Cga-Def demonstra ser um membro de defensinas do tipo arthropod-like. Isso é evidenciado pela sequência 'LTCEL' (**Figura 5**) na região N-terminal (alta semelhança com o padrão 'ATCDL' comumente presente nas defensinas arthropod-like). Embora sua sequência não contenha os mesmos resíduos, possui resíduos similares: Alanina (A) e Leucina (L) são aminoácidos não polares; Ácido aspártico (D) e Ácido glutâmico (E) são aminoácidos R polares de carga negativa, podendo ser uma possível modificação pós-traducional. Além disso, sua estrutura terciária é similar ao que foi reportado em outras defensinas de invertebrados, tanto em artrópodes quanto em moluscos (Hubert *et al.*, 1996). O resultado do alinhamento (**Figura 6**) mostra a divisão clara de assinatura molecular entre os dois tipos de defensinas, sendo *mollusk-like* caracterizada pelo padrão de resíduos de aminoácidos da mesma categoria (GFGC)

e *arthropod-like* caracterizada pelo padrão de resíduos de aminoácidos similares (LTCEL). *Cga-Def* apresenta um alto nível de conservação estrutural, mantendo uma  $\alpha$ -hélice e duas folhas- $\beta$ , similar às do tipo *arthropod-like* (**Figura 6**).

Estudos sugerem que as defensinas *arthropod-like* atuam na permeabilização da membrana celular das bactérias Gram-positivas, porém a cationicidade desses peptídeos é uma característica importante para a atividade antimicrobiana (Hoffmann; Hetru, 1992). Por outro lado, defensinas de ostras (como *Cg-Defs*) possuem o mecanismo de ação baseado no sequestro do lipídeo II, precursor responsável pela biosíntese da parede bacteriana (Schmitt, *et al.*, 2010). A *Cga-Def*, por sua vez, apresentou caráter aniônico ( $pI = 6,25$ ), o que pode dificultar sua interação com moléculas com carga negativa, como os fosfolipídios bacterianos.

Em alguns sistemas, AMPs aniônicos (como defensinas de mamíferos e insetos) podem ter funções indiretas, como: prevenir toxicidade intracelular ao neutralizar a carga positiva do peptídeo antes do processamento; facilitar o direcionamento vesicular ou a secreção controlada; regular a clivagem proteolítica em resposta a sinais infecciosos (Gausepohl *et al.*, 1992). Estudos com peptídeos aniônicos mostraram outros mecanismos de ação, como quelação de íons metálicos e sinergia com outros AMPs (Mitta *et al.*, 1999). Modificações pós-traducionais (fosforilação ou glicosilação), que também alteram os resíduos, podem conferir carga negativa ao AMP. Portanto, é possível que *Cga-Def* atue em sinergia com outro AMP ainda não identificado na mesma espécie, na modulação ou no sequestro do lipídeo II.

A *Cga-Def* apresenta um pró-domínio, comum às defensinas *arthropod-like*, APNKR (Alanina-Prolina-Asparagina-Lisina-Arginina), de caráter básico em sua extremidade C-terminal, dada a presença dos resíduos de Lisina e Arginina (Lys-Arg). Essa composição indica um potencial sítio de clivagem por peptidases da família da furina, do tipo protease de serina. Geralmente o sítio de reconhecimento de clivagem é caracterizado por pares de aminoácidos básicos, como Lys-Arg ou Arg-Lys. A *Cga-Def* mostra-se passível de sofrer esse específico mecanismo de processamento pós-traducional (Bulet *et al.*, 2004; Viljakainen *et al.*, 2015).

Do ponto de vista evolutivo, é importante destacar que defensinas do tipo *arthropod-like* já foram identificadas em outros moluscos bivalves. Sua presença, assim como a presença de defensinas *mollusk-like* em artrópodes, sugere uma

ancestralidade em comum. Por isso, a escolha do molde utilizado para a predição tridimensional foi o de uma defensina *arthropod-like* de inseto (*Phormicin*; PDB: 1ICA), pois há maior similaridade em resíduos de aminoácidos conservados com o padrão de cisteínas e ligações de sulfeto que as estabilizam. Ao contrário de defensinas *mollusk-like*, pois seu padrão é distinto, contendo 8 resíduos de cisteínas estabilizados por 4 ligações dissulfeto. A intensa pressão seletiva no ambiente marinho pode ter favorecido o surgimento dessa defensina (Guryanova *et al.*, 2023).

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo caracterizou a primeira sequência de defensina em *C. gasar*, a qual foi denominada de *Cga-Def*. Essa defensina pertence à superfamília *cis*-defensinas (*Csaβ*), sendo do tipo *arthropod-like*. Essa defensina também diverge da maioria das *cis*-defensinas, pois, diferentemente de outras defensinas já descritas, a *Cga-Def* apresenta natureza aniônica ( $pI = 6,25$ ), o que pode indicar um mecanismo de ação diferente das outras defensinas catiônicas anteriormente descritas em ostras. A presença de uma defensina *arthropod-like* em ostras sugere possível origem por ancestralidade.

Com base nisso, este trabalho adotou uma abordagem de mineração *in silico* de bancos de dados genômicos e transcriptômicos públicos. Essa estratégia bioinformática permite a prospecção sistemática de sequências codificantes de defensinas de maneira não dependente de ensaios laboratoriais iniciais, otimizando tempo e recursos. Apesar de suas limitações, como a dependência da qualidade e anotação dos dados públicos e a necessidade de validação experimental posterior, a caracterização molecular *in silico* oferece um ponto de partida robusto, permitindo a identificação de candidatos, predição de suas propriedades bioquímicas e modelagem de suas estruturas tridimensionais. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para confirmar a atividade antimicrobiana de *Cga-Def* e elucidar seu espectro de ação e mecanismo efetivo contra microrganismos-alvo.

## REFERÊNCIAS

BACHÈRE, E. *et al.* **The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view.** *Fish & Shellfish Immunology*, v. 46, n. 1, p. 50–64, 2015.

BARBIERI, E. S. *et al.* **First detection of Ostreid herpesvirus 1 in wild *Crassostrea gigas* in Argentina.** *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v.166, p.107222, 2019.

BOUCHET, P. *et al.* **The nomenclature of the amphi-Atlantic mangrove oysters.** *Zoologischer Anzeiger*, v. 309, p. 98–101, 24 fev. 2024.

BRASIL. **Boletim da aquicultura em águas da união.** Ministério da pesca e aquicultura. Brasília, 2023, 99p.

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

BULET, P. *et al.* **Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates.** *Immunological reviews*, v. 198, p. 169–84, 2004. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199962>>.

CHARLET, M. *et al.* **Innate Immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk, *Mytilus edulis*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 36, p. 21808–21813, set. 1996.

CHENG, T. *et al.* **Invertebrates blood cells**, in: *Bivalves*, eds A. N. Ratcliffe and F. A. Rowley (London: Academic Press), 233–301, 1981.

CHENG, T. *et al.* **Hemocytes: forms and functions**, in: *The Eastern Oyster *Crassostrea virginica**, eds V. S. Kennedy, R. I. E. Newell, and A. E. Eble (College Park, MD: Sea Grant College, University Of Maryland), 299–333, 1996.

DA SILVA, P. *et al.* **Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil.** *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v.119, p.62-71, 2014.

DEFER, D. *et al.* **Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: The bacterial connection.** *Fish & Shellfish Immunology*, v. 34, n. 6, p. 1439–1447, 22 mar. 2013.

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

DIVONNE, S. *et al.*, **Diversity and functional specialization of oyster immune cells uncovered by integrative single cell level investigation.** *Life*13:RP102622, 2025. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.102622.3>.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. Towards Blue Transformation. Rome, 2022. DOI: <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.

FREIRE, S. *et al.* **Morphological and functional characterization of the oyster *Crassostrea gasar* circulating hemocytes: Cell types and phagocytosis activity**. Fish and Shellfish Immunology Reports, v. 4, p. 100089–100089, 27 fev. 2023.

GAUSEPOHL, H *et al.* **Automated multiple peptide synthesis**. Pept Res. 1992 Nov-Dec;5(6):315-20. PMID: 1283542.

GERDOL, M. *et al.* **Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins**. Frontiers in Immunology, v. 11, 30 abr. 2020.

GUEGUEN, Y. *et al.*, **Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression**. J. Biol. Chem. 281, 313–323, 2006.

GURYANOVA, S. *et al.* **Marine Invertebrate Antimicrobial Peptides and Their Potential as Novel Peptide Antibiotics**. Marine Drugs, v. 21, n. 10, p. 503–503, 23 set. 2023.

HANAN AL-KHALAIFAH *et al.* **Cellular and humoral immune response between snail hosts and their parasites**. Frontiers in Immunology, v. 13, p. 981314–981314, 10 nov. 2022.

HINE, P. **The interrelationships of bivalve haemocytes**. Fish Shellfish Immunol. 9, 367–385. 1999.

HOFFMANN, J.; HETRU, C. **Insect defensins: inducible antibacterial peptides**. Immunology Today, v. 13, n. 10, p. 411–415, jan. 1992.

HUBERT, F. **A Member of the Arthropod Defensin Family from Edible Mediterranean Mussels (*Mytilus galloprovincialis*)**. European Journal of Biochemistry, v. 240, n. 1, p. 302–306, 1 ago. 1996.

KOHEBACH, J. *et al.* **Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in the context of antibiotic resistance**. Marine Drugs, v. 17, n. 6, p. 350, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.785085>.

KOO, H.; SEO, J. **Antimicrobial peptides under clinical investigation**. Peptide Science, v.111, n. 5, 2019.

LEI, J. *et al.* **The antimicrobial peptides and their potential clinical applications**. American Journal of Translational Research, v. 11, n. 7, p. 3919–3931, 2019.

LUZ CUNHA, A. *et al.* **Two epizootic *Perkinsus* spp. events in commercial oyster farms at Santa Catarina, Brazil**. Journal of Fish Diseases, Malden, v.42, n.3, p.455463, 2019.

MAO, Y. *et al.* **Identification and expression analysis on bactericidal permeability-increasing protein (BPI)/lipopolysaccharide-binding protein (LBP) of ark shell, *Scapharca broughtonii*.** Fish Shellfish Immunol 35, 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.025>.

MELLO, D. *et al.* **First evidence of viral and bacterial oyster pathogens in the Brazilian coast.** Journal of Fish Diseases, Malden, v.41, n.3, p.559-563, 2018.

MENDES, S. *et al.* **Pathogens and microorganisms in the mangrove oyster *Crassostrea gasar* cultivated in an estuarine environment in Northeast Brazil.** Brazilian Journal of Biology, v. 83, 1 jan. 2023.

MITTA, G. *et al.* **Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge.** J. Cell Sci. 112, 1999.

OLIVEIRA, A. *et al.* **Occurrence, antibiotic-resistance and virulence of *E. coli* strains isolated from mangrove oysters (*Crassostrea gasar*) farmed in estuaries of Amazonia.** Marine Pollution Bulletin, v. 157, p. 111302, ago. 2020.

PAIVA, J. *et al.* **Oyster (*Crassostrea gasar*) gastrointestinal tract microbiota and immunological responses after antibiotic administration.** Latin American Journal of Aquatic Research, v. 47, n. 1, p. 78–88, 10 mar. 2019.

ROCHA, G. **Prospecção e caracterização molecular de novas defensinas do tipo CSa $\beta$  (*Cg*-Defs) e big defensinas (*Cg*-BigDefs) na ostra *Crassostrea gigas*.** 2020. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

SAEED, S. *et al.* **Antimicrobial Peptides: Bringing Solution to the Rising Threats of Antimicrobial Resistance in Livestock.** Frontiers in Veterinary Science, v. 9, 8 abr. 2022.

SCHMITT, P. *et al.* **Insight into invertebrate defensin mechanism of action: Oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II.** Journal of Biological Chemistry, v. 285, n. 38, p. 29208–29216, 2010.

SCHMITT, P. *et al.* **The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*.** How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. Frontiers in Microbiology, v. 3, p. 160–160, 1 jan. 2012.

SCHMITT, P. *et al.* **Molecular mechanisms of AMPs in oyster immunity.** Marine Biotechnology, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2016.

SCHRODINGER, LLC. **The PyMOL Molecular Graphics System**, Version 1.8. Novembro, 2015. Disponível em: <<http://pymol.org>>

SELSTED, M. *et al.* **Purification Activity Granulocyttest.** Microbiology, v. 45, n. 1, p. 150–154, 1984.

SHAFEE, T. *et al.* **The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 9, p. 2345–2356, 2016.

SHAFEE, T. *et al.* **Convergent evolution of defensin sequence, structure and function.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 74, n. 4, p. 663–682, 2017.

SILVEIRA JR, N. **Predadores, incrustantes e enfermidades.** In: Manual de cultivo de ostras. Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos. Florianópolis, 1997, p. 39–55.

SUPLICY, F. (Org.) **Manual do cultivo de ostras.** Florianópolis: Epagri. p. 189-190, 2022.

VILJAKAINEN, L. **Evolutionary genetics of insect innate immunity.** *Briefings in Functional Genomics*, v. 14, n. 6, p. 407–412, 7 mar. 2015.

WANG Y, *et al.*, **Identification and characterization of a novel defensin from Asian green mussel *Perna viridis*.** *Fish Shellfish Immunol.* 2018 Mar;74:242-249. doi: 10.1016/j.fsi.2017.12.029. Epub 2017 Dec 24. PMID: 29278736.

WU, R. *et al.* **Marine Invertebrate Peptides: Antimicrobial Peptides.** *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 16 dez. 2021.

XU, X. *et al.* **An anionic defensin from *Plutella xylostella* with potential activity against *Bacillus thuringiensis*.** *Bulletin of Entomological Research*, v. 106, n. 6, p. 790–800, 2016.

YANG, Y. S. *et al.* **Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1).** *Biochemistry*, [s. l.], v. 39, n. 47, p. 14436–14447, 2000.

ZHU, S. **Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the *CSaβ* defensins.** *Molecular Immunology*, v. 45, n. 3, p. 828–838, 2008.

## APÊNDICE A

Sequências utilizadas para o alinhamento

Espécie	GenBank	Anotação
<b>Arthropod-like</b>		
<i>Crassostrea gasar</i>	GJZE01003071	<i>Cga-Def</i>
<i>Sacrostrea glomerata</i>	GBJD01009518	<i>Sg-Defg1</i>
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AJQ21502	<i>Mg-ArtLike</i>
<i>Perna viridis</i>	MF362958	<i>Pervi-Def</i>
<i>Protophormia terraenovae</i>	P10891	Insect def A
<i>Aedes aegypti</i>	P81603	<i>Aedae-Defc</i>
<i>Lucilia sericata</i>	HM243535	Lucifensin
<b>Mollusk-like</b>		
<i>Lagria hirta</i>	GDPQ01001753	<i>Laghi-Def</i>
<i>Aeshna cyanea</i>	P80154	<i>Aecy-Def</i>
<i>Magallana gigas</i>	ACQ76280	<i>Cg-Defh1</i>
<i>Magallana gigas</i>	AEO45023	<i>Cg-Defm</i>
<i>Crassostrea virginica</i>	GGQE01077391	<i>Cv-Def</i>
<i>Crassostrea angulata</i>	GGIZ01013527	<i>Ca-Def</i>
<i>Crassostrea hongkongensis</i>	GGKN01014402	<i>Ch-Def</i>