

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

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DO PERFIL
TRANSCRICIONAL DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
STYLICINA NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Marcelo Luiz Brunatto Falchetti

Florianópolis, 2016

Marcelo Luiz Brunatto Falchetti

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DO PERFIL
TRANSCRICIONAL DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
STYLICINA NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Trabalho de Conclusão de Curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina.
Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego Rosa

Florianópolis
2016

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

Falchetti, Marcelo

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DO PERFIL TRANSCRICIONAL DO
PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO STYLICINA NO CAMARÃO *Litopenaeus*
vannamei / Marcelo Falchetti ; orientador, Rafael Diego
da Rosa - Florianópolis, SC, 2016.

77 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Sistema imune de
invertebrados. 3. Peptídeos antimicrobianos aniônicos. I.
Diego da Rosa, Rafael. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Marcelo Luiz Brunatto Falchetti

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DO PERFIL
TRANSCRICIONAL DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
STYLICINA NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

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

Florianópolis, 06 de Julho de 2016

Prof^a. Dr^a. Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Perazzolo
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Andrea Rita Marrero
Universidade Federal de Santa Catarina

Cairé Barreto Vieira
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Diego Rosa pelo constante ensino, atenção, paciência, confiança e orientação durante esses anos de iniciação científica no LIAA.

À banca avaliadora, Prof^ª. Dr^ª. Luciane Perazzolo, Prof^ª. Dr^ª. Andrea Marrero e o biólogo Cairé Barreto pela disponibilização de poder avaliar esse trabalho. Agradeço por poder apresentar esse trabalho para profissionais que tanto admiro.

À CAPES pela bolsa e financiamento do projeto (Projeto CAPES/CIMAR 1974/2014).

A todos os meus amigos de LIAA pelo aprendizado e pelo companherismo nos momentos mais difíceis e mais prazerosos da minha iniciação científica. Obrigado Adriane Fagundes, Amanda Silveira, Augusto Hering, Bruno Dominski, Cairé Barreto, Emily Justino, Fabio Schneider, Gabriel Matos, Graziela Vieira, Jaqueline Coelho, Mariana Pilotto e Samuel Milanez.

Obrigado meus amigos de graduação por terem me ajudado a continuar e chegar nesse ponto, sempre me alegrando e estimulando. Principalmente obrigado Jéssica Copetti, Kelly Inagaki, Laryssa Liz, Manuela Drehmer e Vanessa Miranda.

A todo o corpo técnico do LAMEB pela vontade e disposição em ajudar nas pesquisas e trabalhos. Agradeço principalmente à Chirle Ferreira, Demétrio Gomes Emily dos Santos pelo apoio neste projeto.

Aos professores, por instigarem minha admiração por essa linda área da ciência. Profissionais que sempre estiveram dispostos a ensinar e crescer juntos. Especialistas que, apaixonados, nos apaixonam diariamente.

A todos os funcionários da universidade que auxiliam e possibilitam a manutenção e o exercício dessa instituição. Em especial agradeço à PRAE, os servidores, os profissionais da área da limpeza e do Restaurante Universitário.

Ao meu companheiro Valdriano Polla pelo amor, calma e apoio em todas as minhas escolhas.

E principalmente à minha família pelo amor incondicional, por acreditarem e me fazerem acreditar que sou capaz de realizar os meus sonhos. Amo todos vocês.

A todos aqueles que contribuíram e ainda contribuem para minha formação como pessoa e como biólogo. A todos os presentes na minha história. **Muito obrigado!**

RESUMO

Doenças infecciosas são uma das maiores limitações para o desenvolvimento sustentável da carcinicultura mundial. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas essenciais do sistema imune inato, os quais participam de modo efetivo no combate a agentes infecciosos. As stylicinas (STY) são peptídeos aniônicos, inicialmente identificados no camarão *Litopenaeus stylirostris* (*Ls-Stylicin1* e *Ls-Stylicin2*), e que apresentam atividade contra fungos filamentosos. Até o presente momento, esses AMPs foram descritos apenas em duas espécies de peneídeos, assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar sequências codificantes para stylicinas na espécie de camarão mais cultivada no mundo, *Litopenaeus vannamei*. Foram utilizadas sequências conhecidas de stylicinas para a identificação desse AMP em *L. vannamei*. As sequências nucleotídicas e aminoacídicas obtidas foram analisadas utilizando-se ferramentas de bioinformática. A distribuição da expressão gênica das stylicinas foi avaliada em oito diferentes tecidos/órgãos de animais estimulados ou não com bactérias *Vibrio harveyi* ATCC 14126 mortas por calor e o perfil transcricional nos hemócitos analisado após 48 h de uma infecção viral (WSSV) ou bacteriana (*V. harveyi*) por PCR quantitativa em tempo real. Em *L. vannamei*, foram identificados dois grupos de stylicinas: *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2, com homologia às stylicinas *Ls-Stylicin1* e *Ls-Stylicin2*, respectivamente. No grupo *Litvan* STY1, foram identificadas sequências com a região codificadora completa (*Litvan* STY1-1 com 315 pb e *Litvan* STY1-2 com 318 pb) enquanto que no grupo *Litvan* STY2 foram identificadas apenas sequências parciais. Assim como as demais stylicinas, as sequências de *L. vannamei* contêm um peptídeo sinal (22 resíduos de aminoácidos) seguido de um peptídeo maduro (8,8-9 kDa) aniônico contendo uma região N-terminal rica em resíduos de prolina e uma região C-terminal com 13 resíduos conservados de cisteína. Os transcritos de ambas stylicinas foram detectados na maioria dos tecidos/órgãos estudados: hemócitos, brânquias, estômago, intestino médio e posterior, além de cordão nervoso para *Litvan* STY2. Em animais estimulados, foi observado um aumento de transcritos no estômago, intestino médio e brânquias para *Litvan* STY1 e nos intestinos médio e posterior e cordão nervoso para *Litvan* STY2. Após a infecção bacteriana, apenas os níveis de expressão de *Litvan* STY2 foram induzidos nos hemócitos de camarões. Não foram observadas diferenças nos níveis transcricionais das duas stylicinas após a infecção viral. Em conclusão, na espécie *L. vannamei*

as stylicinas formam um grupo diverso de AMPs, cuja expressão é diferencialmente modulada nos hemócitos frente a infecções bacterianas.

Palavras-chave: sistema imune de invertebrados, crustáceos, peptídeos antimicrobianos aniônicos (AAMPs), Vírus da Síndrome de Macha Branca (WSSV), *Vibrio harveyi*.

ABSTRACT

Infectious diseases are one of the major limitations for sustainable development of shrimp farming worldwide. Antimicrobial peptides (AMPs) are essential molecules of the innate immune system that effectively participate in the combat of infectious agents. Stylicins (STY) are anionic peptides, firstly identified in the shrimp *Litopenaeus stylirostris* (*Ls-stylicin1* and *Ls-stylicin2*), that display antimicrobial activity against filamentous fungi. Until now, these AMPs were only described in two penaeid species, therefore, the objective of this work was to identify and characterize sequences coding for stylicins in the most cultivated shrimp species, *Litopenaeus vannamei*. Previously reported stylicin sequences were used for the identification of this AMP in *L. vannamei*. The obtained nucleotide and amino acid sequences were analyzed using bioinformatics tools. The gene expression distribution of stylicins was evaluated in eight different tissues/organs of shrimps stimulated or not with heat-killed *Vibrio harveyi* ATCC 14126 and the transcriptional profile in hemocytes was analyzed 48 h after viral (WSSV) or bacterial (*V. harveyi*) infections by real-time quantitative PCR. In *L. vannamei*, two stylicins groups were identified: *Litvan* STY1 and *Litvan* STY2 that showed homologies with *Ls-Stylicin1* and *Ls-Stylicin2*, respectively. For the *Litvan* STY1 group, two main complete coding sequences were recognized (*Litvan* STY1-1 with 315 bp and *Litvan* STY1-2 with 318 bp), while for the *Litvan* STY2 group only partial sequences were identified. Like other stylicins, *L. vannamei* stylicins contain a signal peptide (22 amino acid residues) followed by an anionic mature peptide (8,8-9 kDa) containing an N-terminal region rich in proline residues and a C-terminal region with 13 conserved cysteine residues. Transcripts from both stylicins were detected in most of the studied tissues/organs: hemocytes, gills, stomach, midgut and hindgut, and nerve cord for *Litvan* STY2. In stimulated animals, an increase of transcripts was observed in the stomach, midgut and gills for *Litvan* STY1 and midgut, hindgut and nerve cord for *Litvan* STY2. Upon the bacterial infection, only the gene expression levels of *Litvan* STY2 showed to be induced in shrimp hemocytes. No differences were observed in the transcript levels of both stylicins after the viral infection. In conclusion, in *L. vannamei*, stylicins comprise a diverse group of AMPs, whose expression is differentially modulated in hemocytes in response to bacterial infections.

Keywords: invertebrate immune system, crustaceans, anionic antimicrobial peptides (AAMPs), White Spot Syndrome Virus (WSSV), *Vibrio harveyi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar adulto do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	15
Figura 2. Esquema ilustrativo dos principais mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos na superfície ou no interior de células bacterianas	18
Figura 3. Esquema ilustrativo da estrutura primária das stylicinas ...	25
Figura 4. Esquema ilustrativo do estímulo microbiano	30
Figura 5. Esquema ilustrativo das infecções experimentais virais e bacterianas	32
Figura 6. Estruturas das regiões codificadoras de stylicinas das sequências analisadas.	38
Figura 7. Alinhamento nucleotídico da região codificante das stylicinas de camarões peneídeos e cladograma das regiões comuns a todas as sequências	38
Figura 8. Alinhamento nucleotídico e aminoacídico deduzido de <i>Litvan</i> STY1-1	43
Figura 9. Alinhamento nucleotídico e aminoacídico deduzido de <i>Litvan</i> STY1-2	44
Figura 10. Alinhamento aminoacídico de stylicinas do Grupo 1 de <i>Litopenaeus vannamei</i>	45
Figura 11. Alinhamento nucleotídico e aminoacídico deduzido de sequências incompletas de <i>Litvan</i> STY2	47
Figura 12. Alinhamento das sequências aminoacídicas deduzidas das stylicinas (sem peptídeo sinal) dos Grupos 1 e 2 de <i>Litopenaeus vannamei</i>	48
Figura 13. Perfil de migração do RNA total das amostras (<i>pools</i> de 3 camarões) dos oito tecidos/órgãos das duas condições experimentais (não manipulados e estimulados com a bactéria <i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126)	49
Figura 14. Análise semi-quantitativa da distribuição da expressão de stylicinas em oito tecidos/órgãos de camarões após 48 h de um estímulo microbiano em comparação a animais não estimulados	50
Figura 15. Coeficiente de estabilidade dos candidatos a referência ...	51
Figura 16. Curvas de dissociação das reações de RT-qPCR e eficiência dos iniciadores utilizados para a amplificação de <i>Litvan</i> STY1 e <i>Litvan</i> STY2	52
Figura 17. Perfil de expressão gênica das stylicinas <i>Litvan</i> STY1 e <i>Litvan</i> STY2 nos hemócitos de <i>Litopenaeus vannamei</i> após 48 h de uma infecção experimental com o vírus da Síndrome da Macha Branca (WSSV)	53

Figura 18. Perfil de expressão gênica das stylicinas *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2 nos hemócitos de *Litopenaeus vannamei* após 48 h de uma infecção experimental com a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi*. 54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Famílias de peptídeos antimicrobianos (AMPs) caracterizadas em camarões peneídeos	21
Quadro 2. Sequências dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos das stylicinas completas de *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* e *Marsupenaeus japonicus* 45

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAMPs** Peptídeos antimicrobianos aniônicos
ALF Fatores anti-lipopolissacarídeos
AMPs Peptídeos antimicrobianos
CAMPs Peptídeos antimicrobianos catiônicos
CFU Unidades formadoras de colônia
Cq Ciclo de quantificação
dNTPs Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
EST Etiqueta de sequência expressa (*Expressed Sequence Tag*)
FAO Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
kDa kilodaltons
LPS Lipopolissacarídeos
MAS Solução de Alsever modificada
pb Pares de base
pI Ponto isoelétrico teórico
RNAi RNA de interferência
RT-PCR Transcrição reversa seguida de PCR convencional
RT-qPCR Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real
Tm Temperatura de desnaturação (*melting temperature*)
WSSV Vírus da Síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	17
1.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE CAMARÕES PENEÍDEOS	20
1.3. STYLICINAS	24
2. HIPÓTESE	27
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 ANIMAIS	29
4.2. ESTÍMULO MICROBIANO E COLETA DOS TECIDOS	29
4.3. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS VIRAIS E BACTERIANAS	31
4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA	32
4.5. ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	33
4.6. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	34
4.7. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)	34
5. RESULTADOS	37
5.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS CODIFICANTES PARA STYLICINAS NO CAMARÃO <i>L. vannamei</i>	37
5.2. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	49
5.3. PERFIL TRANSCRICIONAL DE STYLICINAS FRENTE A INFECÇÕES VIRAIS E BACTERIANAS	51
6. DISCUSSÃO	55
7. PRINCIPAIS RESULTADOS	61
8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	52
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE A	73

1. INTRODUÇÃO

Milhares de espécies de camarões habitam as águas marinhas e salobras pelo planeta. A maioria é rara, muito pequena, ou não adequada para alimentação humana (HOLTHUIS, 1980). Todas as espécies cultivadas e a maioria das espécies pescadas pertencem à família Penaeidae. As espécies de camarões peneídeos mais cultivadas no mundo são o camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* e o camarão-tigre *Penaeus monodon* (FAO, 2014). A espécie *L. vannamei* (**Figura 1**) vem sendo a preferida em cultivos devido à tolerância a variações de salinidade e temperaturas, rusticidade no manejo, taxa elevada de crescimento, tolerância à alta densidade de estocagem, entre outros (FAO, 2004). Sua produção representou 74,4% do valor total mundial de peneídeos no ano de 2013 (FAO, 2014). No Brasil, a espécie *L. vannamei* foi introduzida nos cultivos da região Nordeste na década de 80, sendo posteriormente introduzida na região Sul, em Santa Catarina, no ano de 1998.

Figura 1. Exemplar adulto do camarão *Litopenaeus vannamei*.



Imagem retirada do arquivo do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA).

O cultivo de camarões é uma importante atividade econômica relacionada à alimentação humana (FAO, 2014). Foi necessária uma intensificação da carcinicultura para suprir a procura de mercado, exigindo maiores investimentos e cuidados. As limitações mais frequentes em relação a essa prática são ambientais (degradação do

ambiente e água imprópria), nutricionais e sanitárias (KAUTSKY et al., 2000). Dessa forma, enfermidades virais e bacterianas epizoóticas, provindas do estresse submetido ao animal pelas condições dos sistemas, vêm causando um prejuízo enorme aos criadores (SOTO-RODRIGUEZ et al., 2015).

Uma doença viral fatal para camarões é a Síndrome da Mancha Branca, tendo seu agente etiológico o vírus envelopado baciliforme WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) (CHANG et al., 1999). Esse vírus infecta especialmente células de origem ectodermal e mesodermal, incluindo hemócitos (principais células imunocompetentes) e, dessa forma, o sistema imunológico desses animais fica seriamente comprometido. As taxas de mortalidade para camarões podem chegar a 100% entre 2 a 7 dias após o aparecimento dos primeiros sinais da doença (WANG et al., 2002). Em 2005 no estado de Santa Catarina, fatores ambientais adversos, envolvendo quedas da temperatura, parecem ter contribuído para que essa virose se propagasse pelas fazendas de cultivo. Os resultados foram trágicos, diminuindo em 96% a produção do estado, passando de 4.189 toneladas em 2004 para 220 toneladas em 2015 (EPAGRI, 2016). Até o momento, a atividade ainda não se restabeleceu completamente no estado.

As bactérias de gênero *Vibrio* são microrganismos Gram-negativos, em forma de haste (curvados ou não), que utilizam um flagelo único e polar para locomoção (FARMER; HICKMAN-BRENNER, 2006). Muitas espécies possuem relações mutualísticas com animais, podendo fazer parte da microbiota, enquanto algumas são patógenas verdadeiras ou patógenas oportunistas. Em camarões peneídeos, elas estão presentes majoritariamente no trato digestivo, brânquias, cutícula e ocasionalmente na hemolinfa (WANG; WANG, 2015). A vibriose é uma enfermidade que se encontra distribuída em instalações de cultivo e afeta a todas as espécies de camarões usadas na aquicultura. A doença produz lesões necróticas em tecidos de animais infectados. Observam-se altas mortalidades em pós-larvas e camarões juvenis, segundo revisão (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). A espécie *Vibrio harveyi* é patógena oportunista e se tornou uma enorme limitação nas produções de camarão da América e da Ásia (RUNGRASSAMEE et al., 2013). Recentemente, uma doença relacionada ao gênero *Vibrio* vem causando perdas nos cultivos de camarões do sudeste asiático e no México, porém ainda sem registros no Brasil, a doença da necrose aguda do hepatopâncreas (*Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* ou AHPND) (NUNAN et al., 2014). Essa doença, causada por cepas específicas de *Vibrio parahaemolyticus*,

acarreta uma severa atrofia do hepatopâncreas, um órgão muito importante para os sistemas digestório e imune, causando mortalidades de até 100% nos cultivos (ZORRIEHZAHRA; BANAEDERAKHSHAN, 2015).

Para combater os patógenos, os camarões contam com seu sistema imune do tipo inato, além das barreiras físicas externas, como a cutícula e a carapaça. A imunidade sistêmica (que ocorre na hemolinfa) conta com reações celulares e humorais. Os principais mecanismos de defesa de camarões são: melanização mediada pelo sistema pró-fenoxidase (proPO), aglutinação celular mediada por lectinas e produção de moléculas citotóxicas, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os peptídeos antimicrobianos. Para mais informações, vide revisão (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

1.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

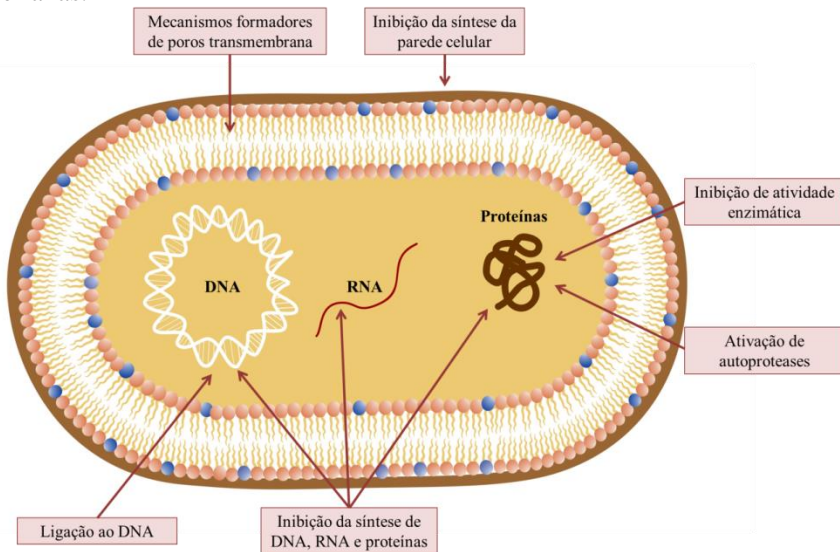
Peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides* ou AMPs) são moléculas produzidas naturalmente por seres vivos e que apresentam propriedades antimicrobianas. Essas moléculas são componentes essenciais do sistema imune inato que são produzidos majoritariamente em células sanguíneas e epiteliais e que podem causar inibição ou morte de microrganismos de forma direta ou indireta (BROGDEN, 2005; ROSA; BARRACCO, 2010). Suas atividades podem ser rápidas e eficientes contra um amplo espectro de microrganismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras, fungos filamentosos e até mesmo alguns protozoários e vírus envelopados (GUANÍ-GUERRA et al., 2010). Os AMPs são moléculas sem relação filogenética, porém com funções análogas, presentes em todos os reinos vivos, desde procariontes a eucariontes pluricelulares (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016).

Os AMPs são classicamente descritos como (1) moléculas relativamente pequenas (até 10 kDa ou com menos de 100 resíduos de aminoácidos); (2) anfipáticas, com uma região hidrofílica e outra hidrofóbica e (3) catiônicas (*Cationic Antimicrobial Peptides* ou CAMPs), significando que possuem uma carga positiva em pH fisiológico por apresentarem uma concentração relativa maior de aminoácidos carregados positivamente (arginina, histidina e lisina). Recentemente, outros grupos de moléculas antimicrobianas, mas que não se adequam à descrição padrão de CAMPs, também foram incluídas nesse grupo. Entre eles estão os polipeptídeos/proteínas grandes, fragmentos derivados de proteínas precursoras, proteínas

multifuncionais e AMPs aniônicos (*Anionic Antimicrobial Peptides* ou AAMPs) (ROSA; BARRACCO, 2010; YOUNT et al., 2006).

Diferentes mecanismos de ação foram sugeridos para explicar a atividade antimicrobiana dos AMPs, principalmente para os CAMPs (BROGDEN, 2005; SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2015). Em geral, essas moléculas atuam em nível de membrana do microrganismo, onde as porções catiônicas podem interagir de forma eletrostática com os fosfolípídeos aniônicos presentes na face externa da membrana, sendo que as suas porções hidrofóbicas podem então se inserir na bicamada lipídica, causando um desequilíbrio da membrana do microrganismo. Assim, os CAMPs podem formar poros na membrana ou atuar de forma detergente (GUANÍ-GUERRA et al., 2010). Não obstante, se sugere que alguns AMPs tenham mecanismos adicionais de atuação intracelular, como inibição da síntese de DNA, RNA, proteínas e parede celular, ativação de autoproteases, inibição da atividade enzimática ou mesmo se ligando a componentes estruturais da parede ou ao DNA (BROGDEN, 2005; SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-GARZÓN, 2015) (**Figura 2**).

Figura 2. Esquema ilustrativo dos principais mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos na superfície ou no interior de células bacterianas.



Adaptado de (BROGDEN, 2005).

Os AAMPs, por sua vez, foram primeiramente descritos no início da década de 80 (LAFORCE; BOOSE, 1981) e receberam menos atenção devido à promessa das atividades antimicrobianas dos CAMPs. Atualmente, esses peptídeos aniônicos estão estabelecidos como parte fundamental da imunidade inata de diversos sistemas eucarióticos (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). Apesar de não se adequarem ao modelo básico de interação eletrostática dos CAMPs, atividades de AAMPs foram descritas contra vários microrganismos. Os AAMPs podem ser constitutivamente expressos, induzidos ou clivados de proteínas precursoras, algumas delas sem função primária antimicrobiana (GOUMON et al., 1998; RIEG et al., 2004). Para facilitar a interação com as membranas de microrganismos, essas moléculas parecem interagir diretamente com receptores ou adotar estruturas anfipáticas, variando de lineares em α -hélice até cíclicos arranjados por pontes de dissulfeto (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). Alguns AAMPs se utilizam de modificações pós-transcricionais para ligar íons metálicos em si, formando pontes salinas catiônicas e interagindo com componentes carregados negativamente da membrana dos microrganismos (HARRIS; DENNISON; PHOENIX, 2009). Apesar do grande número de pesquisas sobre os AMPs de maneira geral, pouco ainda se sabe sobre esses peptídeos aniônicos, suas interações e seus mecanismos de ação antimicrobiana.

Os AMPs diversas vezes possuem outras funções além da antimicrobiana, tendo participação em diversas incumbências biológicas e sendo assim consideradas moléculas multifuncionais (SMITH; DYRYNDA, 2015). Entre essas atividades conhecidas, algumas são muito importantes para o sistema imune, como participar de mecanismos imunoregulatórios, produzir/liberar citocinas, controlar e selecionar a microbiota do hospedeiro (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016; ROSA; BARRACCO, 2010). Sendo assim, os AMPs integram, organizam e estruturam a imunidade inata do hospedeiro de diversas formas.

Os primeiros AMPs foram isolados independentemente há aproximadamente 40 anos (defensinas, cecropinas e magaininas) e, desde então, mais de 2.700 AMPs foram identificados e adicionados no banco de dados de AMPs, o *Antimicrobial Peptide Database* ou APD (<http://aps.unmc.edu/AP>, acessado em: 4 de junho de 2016). Muitas dessas pesquisas são justificadas por cunho terapêutico ou econômico, sendo que a maior parte dos AMPs caracterizados em invertebrados provém de espécies cultivadas e exploradas, como os camarões penéides.

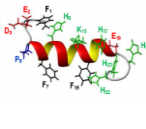
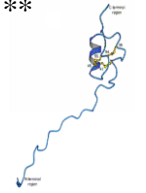
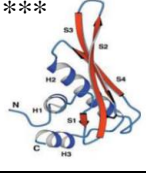
1.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE CAMARÕES PENEÍDEOS

Somente em meados da década de 90, foram identificados os primeiros peptídeos com atividade antimicrobiana em crustáceos. O primeiro AMP isolado e caracterizado em um crustáceo foi um peptídeo catiônico de 6,5 kDa no caranguejo *Carcinus maenas* (SCHNAPP; KEMP; SMITH, 1996). Esse peptídeo, rico em resíduos de prolina, apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SCHNAPP; KEMP; SMITH, 1996). Em crustáceos, 15 famílias de AMPs foram identificadas, sendo geralmente catiônicas, codificadas por genes e majoritariamente produzidas em hemócitos (ROSA; BARRACCO, 2010).

Em camarões, o primeiro AMP descrito foi a peneidina, isolada da hemolinfa de *L. vannamei* (DESTOUMIEUX et al., 1997). Diferentes AMPs foram identificados e caracterizados em camarões, alguns dentro da descrição clássica, outros não, como as histonas, seus fragmentos e peptídeos derivados do carreador de oxigênio, a hemocianina (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2001; PATAT et al., 2004).

O grupo das histonas é um bom exemplo de proteínas multifuncionais que apresentam atividade antimicrobiana. Histonas são proteínas responsáveis pela manutenção da organização nuclear, importantes para a regulação gênica e no empacotamento do DNA no núcleo. Essas proteínas, encontradas em todos os reinos vivos, são altamente catiônicas, uma característica importante para sua interação com o DNA, uma molécula aniônica. Em camarões, a atividade antimicrobiana das histonas foi primeiramente descrita em *L. vannamei* (PATAT et al., 2004) (**Quadro 1**). A reação de defesa celular chamada ETosis, na qual fagócitos liberam DNA associado a histonas que enredam e matam microrganismos, é a que melhor descreve a atividade das histonas como antimicrobianas (GUIMARÃES-COSTA et al., 2012). A reação de ETosis, descrita em protostômios, como os crustáceos, e também em deuterostômios é desencadeada principalmente por infecções ou danos teciduais (BRINKMANN et al., 2004; NG et al., 2013). Histonas e seus fragmentos derivados são ativos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus, com modos de ação variados, como permeabilização da parede celular ou mesmo ligação ao material genético bacteriano (DNA ou RNA) (KAWASAKI; IWAMURO, 2008).

Quadro 1. Famílias de peptídeos antimicrobianos (AMPs) caracterizadas em camarões peneídeos.

		Grupos/Tipos	MM em kDa	pI (carga)	Espectro de atividade antimicrobiana	Estrutura tridimensional
AMPs multifuncionais ou derivados de proteínas precursoras	Histonas e seus fragmentos	H2A	11,3	11,2 (catiônicos)	Bactérias Gram-positivas	nd
	Fragmentos da hemocianina	-	2,7 a 8,3	5,6 a 6,5 (aniônicos)	Fungos filamentosos	* 
AMPs codificados por genes	Peneídnas	Sub-família I PEN1/2 PEN3 PEN4 PEN5	5,5 a 12,1	>9 (catiônicos)	Bactérias Gram-positivas Fungos filamentosos	** 
		Sub-família II <i>Mj</i> -PenII				
	ALFs	ALF-A ALF-B ALF-C ALF-D ALF-E	7 a 11	4,3 a 10,9 (aniônicos e catiônicos)	Bactérias Gram-positivas Bactérias Gram-negativas Leveduras Fungos filamentosos Vírus encapsulados	*** 
	Crustídnas	I II III IV	5 a 22	4 a 8 (aniônicos e catiônicos)	Bactérias Gram-positivas Bactérias Gram-negativas Fungos filamentosos	nd
	Stylicídnas	-	8,7 a 8,9	4,7 a 5 (aniônicos)	Fungos filamentosos	nd

AMPs: peptídeos antimicrobianos; MM: massa molecular; pI: ponto isoelétrico teórico; nd: não definida. **Pv*Hct (PDB: 2N1C); ***Litvan* PEN3 (PDB: 1UE0); ****ALFPm3* (PDB: 2J0B).

A hemocianina é a proteína carreadora de oxigênio de muitos artrópodes e cefalópodes. Em crustáceos, essa molécula pode liberar AMPs ricos em resíduos de histidina (aminoácido básico) em resposta a desafios microbianos. Em camarões, esses fragmentos de hemocianina são peptídeos de 2,7 a 8,3 kDa aniônicos (**Quadro 1**) (PETIT et al., 2016). Esses AMPs foram primeiramente isolados da hemolinfa do camarão *L. vannamei* (PvHct), os quais são gerados a partir da hidrólise da porção C-terminal da hemocianina (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2001). Os PvHct são peptídeos aniônicos e parecem ser ativos somente contra fungos filamentosos, se ligando seletivamente na parede celular fúngica e causando permeabilização por adotar uma estrutura anfipática em α -hélice (PETIT et al., 2016).

Além desses, 4 famílias de AMPs codificadas por genes também foram caracterizadas em camarões peneídeos: as peneidinas (DESTOUMIEUX et al., 1997), os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) (GROSS et al., 2001; SUPUNGUL et al., 2002), as crustinas (BARTLETT et al., 2002) e a mais nova família das stylicinas (ROLLAND et al., 2010).

As peneidinas (PEN) são peptídeos de 5 a 12 kDa encontrados somente em camarões da família Penaeidae, exclusivamente catiônicos ($pI > 9$) e divididos em duas sub-famílias (I e II) (**Quadro 1**). Os membros da sub-família I se dividem em 4 sub-grupos (PEN1/2, PEN3, PEN4 e PEN5), os quais são codificados por genes distintos (CUTHBERTSON et al., 2002) e contendo, por sua vez, uma diversidade de isoformas gerada por polimorfismos genéticos (TASSANAKAJON et al., 2011). Estruturalmente, os elementos da sub-família I contêm uma região N-terminal linear rica em resíduos de prolina e arginina e uma região C-terminal que contém uma hélice anfipática e duas voltas estabilizadas devido a três pontes dissulfídicas formadas por seis resíduos de cisteína (YANG et al., 2003). A sub-família II contém até o momento apenas um único membro, a *Mj-PenII*, identificada no camarão *Marsupenaeus japonicus*. Essa molécula, por sua vez, contém em sua estrutura uma região N-terminal adicional rica em resíduos de serina (AN et al., 2016). A expressão das PEN é restrita aos hemócitos, presentes na circulação ou infiltrados nos diferentes tecidos, onde são constitutivamente sintetizadas e armazenadas em seus grânulos até o momento de sua liberação (DESTOUMIEUX et al., 2000). As PEN são moléculas com duas funções, atuando como AMPs e citocinas autócrinas, auxiliando na promoção da fagocitose ou atraindo hemócitos para locais de injúria (DESTOUMIEUX et al., 2000). As PEN apresentam diversas e potentes atividades antimicrobianas,

principalmente contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos (AN et al., 2016; CARRIEL-GOMES et al., 2007; DESTOUMIEUX et al., 1999).

A família dos ALFs é composta por peptídeos/polipeptídeos de 7-11 kDa, catiônicos ou aniônicos, os quais foram inicialmente isolados e caracterizados nos hemócitos granulares de limúldeos. As primeiras sequências de ALF em camarões foram identificadas em *Litopenaeus setiferus* e *P. monodon* (SUPUNGUL et al., 2002) pela da técnica de EST (*Expressed Sequence Tags*). Estruturadamente, os ALFs contêm dois resíduos conservados de cisteína que participam na formação de um grampo (β -hairpin) que concentra uma região altamente anfipática do peptídeo, onde está presente o domínio de ligação a lipopolissacarídeos (LPS) (HOESS et al., 1993). As estruturas tridimensionais do ALF-L do limúldeo *Limulus polyphemus* e do ALFPm3 de *P. monodon* consistem em três α -hélices comprimidas contra quatro folhas- β (HOESS et al., 1993; YANG et al., 2009). Em camarões peneídeos, os ALFs formam uma família diversa de AMPs dividida em cinco principais grupos: ALF-A a ALF-E, codificados por genes distintos (**Quadro 1**) (JIANG et al., 2015; ROSA et al., 2013). Assim como as PEN, a expressão do ALFPm3 (um ALF-B de *P. monodon*) também está restrita aos hemócitos (DESTOUMIEUX et al., 2000; SOMBOONWIWAT et al., 2008). Os ALFs carregados positivamente (em especial os do Grupo B) possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e vírus envelopados (CARRIEL-GOMES et al., 2007; TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). Os ALFs aniônicos do grupo D, por sua vez, não possuem atividade antimicrobiana e sua função nas respostas de defesa de camarões ainda é desconhecida (ROSA et al., 2013). Além do mais, por silenciamento gênico pós-transcricional (via RNA de interferência ou RNAi), foi mostrado que os ALFs podem atuar ainda na manutenção da microbiota presente na hemolinfa (PONPRATEEP et al., 2012; WANG et al., 2014).

As crustinas são peptídeos/polipeptídeos de 5,57-22,88 kDa que foram inicialmente isolados e caracterizados a partir dos hemócitos granulares do caranguejo *C. maenas* (RELF; CHISHOLM, 1999). Eles são AMPs que contêm uma região C-terminal rica em resíduos de cisteína, onde se localiza o domínio WAP (*Whey Acidic Protein*) (RELF; CHISHOLM, 1999). O termo “WAP” deriva do nome dado a uma família de proteínas inicialmente descritas do leite de mamíferos que possui geralmente um domínio de 50 aminoácidos, onde são encontrados oito resíduos conservados de cisteína que formam quatro

pontes de dissulfeto (RANGANATHAN et al., 1999). Entre as funções descritas para essas proteínas contendo domínio WAP estão a regulação e diferenciação tecidual, inibição de proteases e atividade antimicrobiana (SMITH et al., 2008). A família das crustinas está dividida em quatro tipos (Tipo I a IV) com organizações estruturais distintas (**Quadro 1**). As crustinas do Tipo I apresentam, além do domínio WAP na região C-terminal, um domínio rico em resíduos de cisteína na região N-terminal, enquanto que as crustinas do Tipo II apresentam, além dessa região, um domínio N-terminal rico em resíduos de glicina (SMITH et al., 2008). As crustinas do Tipo III apresentam somente o domínio WAP (*Single WAP Domain proteins* ou SWD) e as do Tipo IV dois domínios WAP (*Double WAP Domain proteins* ou DWD) (CHEN; HE; XU, 2008). As crustinas são principalmente ativas contra bactérias Gram-positivas, mas podem ainda apresentar uma atividade de inibição de proteases, em virtude da presença do domínio WAP (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). Experimentos de RNAi mostraram que crustinas do Tipo II, que nos testes *in vitro* não apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas, auxiliam na resistência de *L. vannamei* e *M. japonicus* a *V. penaeicida* (bactéria Gram-negativa) *in vivo* (HIPOLITO et al., 2014; SHOCKEY et al., 2009).

1.3. STYLICINAS

As stylicinas formam a mais nova família de AMPs descrita em camarões peneídeos (**Quadro 1**). Stylicinas são peptídeos aniônicos (do grupo dos AAMPs) de 8,7 a 8,9 kDa encontrados exclusivamente em camarões peneídeos (LIU et al., 2015; ROLLAND et al., 2010). Esses peptídeos foram inicialmente identificados no camarão *Litopenaeus stylirostris* em um estudo transcriptômico que avaliou a capacidade desses animais de sobreviver a infecções bacterianas (DE LORGERIL et al., 2005). Estando abundantemente expresso em hemócitos de camarões capazes de sobreviver a infecção, esse peptídeo parece estar envolvido com a resposta imune frente a bactérias patogênicas do gênero *Vibrio* (DE LORGERIL et al., 2005). Atualmente, três membros dessa família foram caracterizados, dois em *L. stylirostris* (*Ls-Stylicin1* e *Ls-Stylicin2*), primeiro relato e de onde o nome desses AMPs surgiu, e um em *M. japonicus* (*Mj-sty*) (LIU et al., 2015; ROLLAND et al., 2010). Em suas estruturas primárias, há uma região N-terminal contendo resíduos de prolina e uma região C-terminal contendo 13 resíduos conservados de cisteína (**Figura 3**). As stylicinas de *L. stylirostris* (*Ls-*

Stylicin1) e *M. japonicus* (*Mj-sty*) possuem uma organização gênica semelhante: dois éxons separados por um íntron (LIU et al., 2015; ROLLAND et al., 2010). A *Ls-Stylicin1* é expressa nos hemócitos e é ativa contra os fungos filamentosos (*Fusarium oxysporum*), apresentando baixa atividade contra bactérias Gram-negativas (ROLLAND et al., 2010). Além do mais, essa molécula apresenta uma potente atividade de ligação ao LPS, podendo aglutinar *V. penaeicida* (bactéria Gram-negativa) *in vitro* (ROLLAND et al., 2010).

O único relato de stylicinas em *L. vannamei* foi em um estudo que avaliou o perfil de expressão de genes associados ao sistema imune em camarões após infecções letais com o WSSV ou com o fungo *Fusarium solani* (GONCALVES et al., 2014). Nesse trabalho, os níveis de transcritos de duas diferentes stylicinas mostraram-se drasticamente reduzidos em animais em morte eminente (GONCALVES et al., 2014). Apesar desse primeiro relato em nível de regulação transcricional, nada se sabe a respeito da estrutura, diversidade e função desses AMPs nas respostas de defesa do camarão *L. vannamei*.

Figura 3. Esquema ilustrativo da estrutura primária das stylicinas.



A sequência aminoacídica das stylicinas é composta por um peptídeo sinal (caixa cinza) seguido por um peptídeo maduro contendo uma região N-terminal rica em resíduos de prolina (caixa rosa) e uma região C-terminal contendo 13 resíduos conservados de cisteína (caixa azul).

A aquicultura tem feito uso de antibióticos para prevenir e controlar infecções. Essa prática, contudo, é contra-indicada por contaminar o ambiente, afetar as produções produzindo camarões impróprios ao consumo humano e por desenvolver resistência nos microrganismos. Buscando-se então novos agentes farmacológicos para essa problemática, antibióticos alternativos e naturais como os AMPs, por serem produzidos por espécies cultivadas e ecologicamente inócuos, poderiam contribuir para o sucesso dos cultivos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Além do mais, o entendimento sobre a dinâmica e a atividade dos AMPs pode auxiliar nos modelos de cultivo para a seleção de animais resistentes ou no controle de enfermidades.

Das quatro famílias de AMPs codificadas por genes em camarões, as stylicinas são os únicos AMPs que ainda não foram descritos em *L. vannamei*, a espécie mais cultivada do mundo. Assim,

faz-se necessária a caracterização dessa família de AMPs, tanto em nível molecular quanto transcricional.

2. HIPÓTESE

O gene codificante para o peptídeo antimicrobiano stylicina é expresso nos hemócitos do camarão *Litopenaeus vannamei* e é modulado frente a infecções virais e bacterianas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a identificação e a caracterização molecular e transcricional do peptídeo antimicrobiano stylicina no camarão *Litopenaeus vannamei*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar sequências codificantes para stylicinas no camarão *L. vannamei*;
- Analisar as sequências obtidas e compará-las com sequências codificantes para stylicinas em espécies correlatas;
- Verificar a distribuição da expressão gênica de stylicinas em diferentes tecidos/órgãos de camarões após um estímulo microbiano;
- Caracterizar o perfil transcricional de stylicinas nos hemócitos de camarões experimentalmente infectados com o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) ou com a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* (10 ± 1 g), de ambos os sexos, foram cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura (UFSC/CCA/LCM) e mantidos no Setor de Aquários do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA). Os animais foram aclimatados por sete dias em tanques contendo aproximadamente 100 L de água salgada (com aeração constante e renovação diária da água de 50%) e alimentados uma vez ao dia com ração comercial (Guabi; POTIMAR 35 EXT) a uma biomassa de 2% do peso corporal. A temperatura do ar foi mantida a 26°C, sendo que a temperatura da água permaneceu a 23°C durante os experimentos.

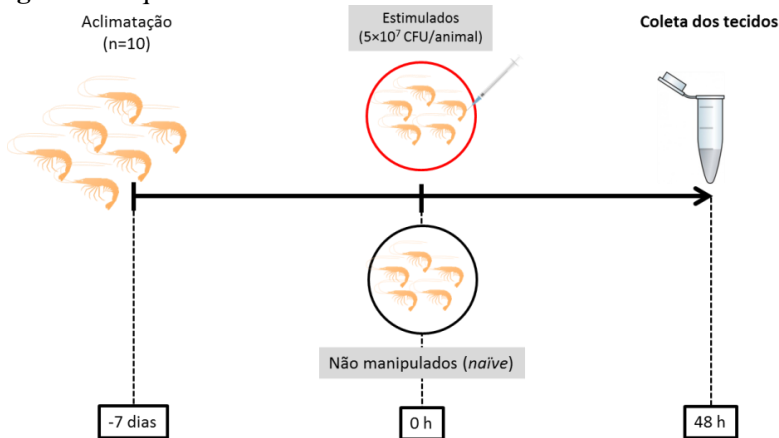
4.2. ESTÍMULO MICROBIANO E COLETA DOS TECIDOS

Para o estímulo microbiano, foi utilizada a bactéria marinha Gram-negativa *Vibrio harveyi* ATCC 14126. A cultura de *V. harveyi* foi realizada em meio LB-NaCl (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 3% NaCl, pH 7,2) a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 12-16 h sob agitação (150 rpm). Em seguida, a cultura bacteriana foi centrifugada ($1.000 \times g$ por 10 min) e suspendida em água do mar filtrada ($0,45 \mu\text{m}$). A concentração bacteriana foi ajustada espectrofotometricamente (Biowave II WPA[®]) para a densidade óptica $\text{DO}_{600 \text{ nm}} = 0,52$, correspondente a 5×10^8 unidades formadoras de colônias (*Colony-Forming Units* ou CFU) por mL. As bactérias foram então inativadas por calor a 70°C por 20 min e plaqueadas em meio LB-NaCl ágar (LB-NaCl acrescido de 1,5% de ágar) para confirmação da eficiência do tratamento. Os animais ($n=10$) foram aclimatados durante 7 dias. Em seguida, foram injetados intramuscularmente, entre o primeiro e o segundo segmentos da região dorsal dos camarões ($n=5$), 100 μL da solução contendo as bactérias mortas (5×10^7 CFU por animal). Como controle, foram utilizados animais não manipulados (grupo *naïve*; $n=5$) (**Figura 4**).

Após 48 h da injeção, a hemolinfa dos cinco animais de cada grupo foi coletada e agrupada em uma única amostra por condição. Extraiu-se a hemolinfa pela região ventral do abdome, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, por inserção de uma agulha ($13 \times 0,4$ mm) acoplada a uma seringa estéril de 1 mL. A

hemolinfa foi coletada na presença de solução anticoagulante (Solução de Alsever Modificada ou MAS: 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) (proporção 1:2, sendo 1 parte de hemolinfa para 2 de MAS), centrifugada ($1.500 \times g$ por 10 min a 4°C) e o precipitado celular suspenso em 1 mL do reagente TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]). Após a extração da hemolinfa, os camarões foram anestesiados por hipotermia (-20°C por 20 min) e posteriormente sacrificados para a dissecação e coleta dos seguintes tecidos/órgãos: estômago, hepatopâncreas, intestino médio, intestino posterior, músculo, brânquias e cordão nervoso. Após a coleta, os tecidos foram lavados em solução Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4) e macerados na presença de 1 mL do reagente TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]) com o auxílio de pistilos estéreis acoplados ao homegeneizador VWR[®] *Disposable Pellet Mixers and Cordless Motor*. Após centrifugação ($12.000 \times g$ por 10 min a 4°C), os sobrenadantes foram coletados e conservados a -20°C para a posterior extração de RNA total (item 4.4.).

Figura 4. Esquema ilustrativo do estímulo microbiano.



-7 dias: período de aclimação dos animais. **0 h:** estímulo microbiano. **48 h:** coleta dos tecidos/órgãos e processamento das amostras. Círculo vermelho: grupo estimulado com *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (bactérias inativadas por calor); Círculo preto: animais não manipulados (grupo *naïve*).

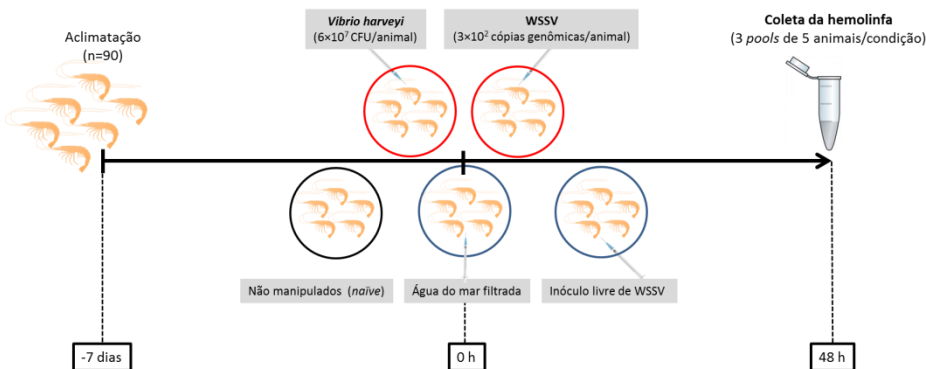
4.3. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS VIRAIS E BACTERIANAS

Para os ensaios de infecção viral, foi utilizado o vírus causador da Síndrome da Macha Branca (WSSV). Para o preparo do inóculo viral, 10 g de tecido muscular (abdome) de camarões diagnosticados positivos para o WSSV, foram homogeneizados em tampão Tris-NaCl estéril e gelado (1:10; p:v) e centrifugados ($3.000 \times g$ por 30 min a 4°C). O sobrenadante foi recuperado e centrifugado ($12.000 \times g$ por 40 min a 4°C), filtrado ($0,45 \mu\text{m}$) e armazenado em nitrogênio líquido. Seguindo a mesma metodologia, foi preparado um inóculo livre de WSSV, utilizando tecido muscular de animais diagnosticados como negativos para o vírus. Após um período de aclimação de 7 dias, os animais foram injetados intramuscularmente ($n=15$), entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais da região dorsal, com $100 \mu\text{L}$ do inóculo viral (3×10^2 cópias genômicas por animal). Essa dose viral foi anteriormente padronizada em nosso laboratório, a qual é capaz de matar 50% dos animais (DL_{50}) num período de 5-7 dias. Após a injeção, os camarões foram dispostos em tanques contendo 16 L de água salgada (5 animais por tanque) com renovação diária de 50%. Após 48 h da infecção, foi realizada a coleta da hemolinfa (3 *pools* de 5 animais), segundo descrito no item 4.2. Os hemócitos obtidos por centrifugação ($1.500 \times g$ por 10 min a 4°C) foram suspensos em 1 mL do reagente TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]) para a posterior extração de RNA total (item 4.4.). Como controle, foram utilizados animais não manipulados (grupo *naïve*; $n=15$) e animais injetados com $100 \mu\text{L}$ do inóculo livre de WSSV ($n=15$) (**Figura 5**).

Para os ensaios de infecção bacteriana, foi utilizada a bactéria *V. harveyi* ATCC 14126. Os camarões foram aclimatados por 7 dias e, logo após, injetados intramuscularmente ($n=30$), entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais da região dorsal, com $100 \mu\text{L}$ do inóculo bacteriano vivo (6×10^7 CFU por animal) em água do mar filtrada. Essa dose bacteriana foi anteriormente padronizada no nosso laboratório, a qual é capaz de matar 50% dos animais (DL_{50}) num período de 48 horas. Após a infecção, os camarões foram dispostos em tanques contendo 16 L de água salgada (5 animais por tanque) com renovação diária de 50%. Os camarões ficaram sem alimentação nas 48 h seguintes, quando foi realizada a coleta da hemolinfa (3 *pools* de 5 animais), segundo descrito no item 4.2. Os hemócitos obtidos por centrifugação ($1.500 \times g$ por 10 min a 4°C) foram suspensos em 1 mL do reagente TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]) para a posterior extração de RNA total (item 4.4.). Animais

não manipulados (grupo *naïve*; n=15) e injetados com 100 µL de água do mar estéril (n=15) foram utilizados como controle (**Figura 5**).

Figura 5. Esquema ilustrativo das infecções experimentais virais e bacterianas.



-7 dias: início do período de aclimação dos animais. **0 h:** infecção experimental. **48 h:** coleta da hemolinfa e processamento das amostras. Círculos vermelhos: grupos experimentais (camarões infectados com o WSSV ou com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126); Círculos azuis: controles experimentais (animais injetados com inóculo livre de WSSV ou com água do mar filtrada); Círculo preto: animais não manipulados (grupo *naïve*). Para cada grupo experimental, foram feitos 3 *pools* de 5 animais.

4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

Para a obtenção do RNA total, as amostras conservadas em TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]) foram submetidas à extração com clorofórmio. Após centrifugação (12.000 ×g por 15 min a 4°C), o RNA total obtido foi precipitado com isopropanol e lavado 2 vezes com etanol 75% gelado. O precipitado de RNA foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases e tratado com 1 U da enzima DNase I (Thermo Scientific[®]) por 15 min a 37°C para a eliminação de DNA genômico (gDNA) contaminante. A enzima DNase I foi então inativada (70°C por 15 min) e as amostras precipitadas com 0,3 M acetato de sódio (pH 5,2) e isopropanol (1:1; v:v). Finalmente, o RNA foi lavado com etanol 75% gelado e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases a 70°C.

Para a avaliação da distribuição gênica, o RNA total foi extraído individualmente das 5 amostras dos 8 tecidos/órgãos coletados das 2

condições experimentais (animais estimulado e não manipulados). A concentração das amostras foi determinada pela leitura de absorbância em 260 nm ($A_{260\text{nm}} = 1$, equivalente a 40 $\mu\text{g RNA/mL}$) no espectrofotômetro NanoVue PlusTM. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do RNA obtido, sendo a integridade das amostras avaliada em gel de agarose (0,8%). A partir dos resultados de pureza ($A_{260/280}$: $1,8 \geq 2,1$) e integridade (sem sinais visíveis de degradação em gel de agarose), as 3 melhores amostras de cada tecido/órgão (de cada condição) foram agrupadas em um único *pool*, utilizando a mesma quantidade de RNA total extraído (5 μg de cada amostra). Em seguida, as amostras dos *pools* de RNA foram re-quantificadas espectrofotometricamente e a integridade avaliada em gel de agarose 0,8%. As amostras de RNA total dos hemócitos das infecções experimentais virais e bacterianas (coletadas em *pools* de 5 animais por condição) foram diretamente processadas e a concentração, pureza e integridade avaliadas conforme anteriormente descrito.

Para a síntese de cDNA, 1 μg de RNA total foi reversamente transcrito na presença de 200 U da enzima RevertAid[®] Reverse Transcriptase (Thermo Scientific[®]), 0,5 mM de dNTP Mix (Sinapse Inc[®]), 20 U da enzima RiboLockTM RNase Inhibitor (Thermo Scientific[®]) e 0,5 μg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Sinapse Inc[®]), num volume final de 20 μL . As amostras foram incubadas a 42°C por 60 min e a enzima inativada por calor a 65°C por 15 min.

4.5. ANÁLISES *IN SILICO*

As sequências nucleotídicas codificantes para as stylicinas dos camarões *L. stylirostris* (*Ls-Stylicin1*: EU177435; *Ls-Stylicin2*: EU177437) e *M. japonicus* (*Mj-sty*: KR063277) foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) para a busca de sequências homólogas em bancos de dados de EST (*Expressed Sequence Tags*) não anotados de *L. vannamei*. As buscas foram realizadas utilizando-se a ferramenta tBLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). O programa ExPasy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) foi utilizado para a obtenção das sequências aminoacídicas deduzidas e o programa ExPasy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) para a determinação de parâmetros bioquímicos como massa molecular e ponto isoelétrico teórico (pI). O software SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) foi utilizado para predizer a

existência de peptídeo sinal, enquanto que o software SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi utilizado para a busca de domínios proteicos conservados. Os alinhamentos das sequências foram gerados a partir do programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Por fim, os cladogramas foram construídos com auxílio do programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) utilizando o método *Neighbor Joining* (utilizando os parâmetros padrão do programa), com 1.000 replicatas.

4.6. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

As análises semi-quantitativas de expressão gênica foram realizadas por transcrição reversa seguida de PCR convencional (RT-PCR). As reações de RT-PCR foram realizadas em um volume final de 15 μL contendo 2 mM de MgCl_2 , 0,4 mM de dNTP Mix, 0,4 μM dos iniciadores senso e antissenso, 1 U da enzima *Taq* DNA polymerase (Sinapse Inc[®]) e 1 μL de cDNA (diluído 10 vezes). As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, hibridização a 57°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s e extensão final a 72°C por 10 min. As sequências dos iniciadores estão apresentadas no **Quadro 2**. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo (Amresco[®]). Os tamanhos moleculares foram comparados com o padrão molecular de 100 pb (Sinapse Inc[®]). Como controle de expressão e de qualidade das amostras, foi avaliada a expressão do gene β -actina (**Quadro 2**) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, hibridização a 50°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. Os géis foram visualizados em um fotodocumentador utilizando fluorescência UV e digitalizados no programa DigiDoc-ItLS.

4.7. 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 o sistema *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems[®]). As reações foram executadas em um volume final de 15 μL (em duplicatas) na presença de 1 μL de cDNA (diluído 10 vezes), 0,2 μM de cada

Quadro 2. Sequências dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica.

Gene	GenBank	Sequências dos iniciadores (5' - 3')		Produto de amplificação	Eficiência (%)
β-actina	*	Senso	TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG	846 pb	**
		Antissenso	TCACCAACTGGGATGACATGG		
Lv EF1α	GU136229	Senso	TGGCTGTGAACAAGATGGACA	103 pb	97,2
		Antissenso	TTGTAGCCCACCTTCTTGACG		
Lv RpL40	KJ831563	Senso	GAGAATGTGAAGGCCAAGATC	104 pb	95,3
		Antissenso	TCAGAGAGAGTGCGACCATC		
Lv RpS6	FE080516	Senso	AGCAGATACCCTTGGTGAAG	193 pb	98,8
		Antissenso	GATGCAACCACGGACTGAC		
Lv RpS3A	BF023924	Senso	GGCTTGCTATGGTGTGCTCC	101 pb	97,4
		Antissenso	TCATGCTCTTGGCTCGCTG		
Litvan STY1	BE188497	Senso	CACAAGAGTGCCCACCGTG	125 pb	98,9
		Antissenso	ACATTCGCAGTTATGGTAGCC		
Litvan STY2	CK591498	Senso	CACAAGAGTGCCCACCGTG	139 pb	97,1
		Antissenso	CACACAGGCTGCCGACATAA		

LvEF1α: Fator de elongação 1α; LvRpL40, LvRpS6 e LvRpS3A: proteínas ribossomais L40, S6 e S3A, respectivamente; Litvan STY1: stylicina 1; Litvan STY 2: stylicina 2. *CADORET et al., 1999. **O gene β-actina foi utilizado somente nas análises semi-quantitativas de expressão gênica (sem valores de eficiência).

iniciador e 7,5 μL Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2× (Thermo Scientific®). As sequências dos iniciadores estão apresentadas no **Quadro 2**. Para a amplificação, foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e hibridização/extensão a 60°C por 1 min. A especificidade das reações foi confirmada pela análise de curvas de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s), realizada após as etapas de amplificação. Para a determinação da eficiência dos iniciadores, foi avaliada a amplificação das sequências de interesse utilizando-se diluições seriadas (curva padrão: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) de um pool de todos os cDNAs das amostras de hemócitos das infecções virais e bacterianas. Os valores de C_q (ciclo de quantificação) de cada diluição foram utilizados para a construção de uma curva linear, cujo valor de slope (coeficiente angular da reta) foi utilizado para o cálculo da eficiência (E) dos pares de iniciadores segundo a fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$.

O programa RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/>) foi utilizado para a escolha da melhor condição referência entre quatro genes candidatos: LvEF1α (GenBank: GU136229), LvRpL40 (GenBank: KJ831563), LvRpS6 (GenBank: FE080516) e LvRpS3A (GenBank: BF023924). Nesse programa, a escolha está baseada no cálculo do coeficiente de estabilidade dos genes candidatos utilizando algoritmos de quatro outros programas (*geNorm*, *Normfinder*, *BestKeeper* e *Comparative*

ΔCT), que leva em consideração a variação dos valores de Cq entre as diferentes amostras. Assim, quanto menor o valor do coeficiente, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais. Para uma análise mais apurada, foi considerada ainda a média geométrica dos valores de Cq das diferentes combinações dos genes candidatos (VANDESOMPELE et al., 2002).

Os valores de expressão relativa foram calculados com base nos valores de Cq dos genes de interesse em relação aos valores de Cq da referência ($\Delta Cq = Cq$ do gene alvo subtraído do Cq da referência). Os níveis de expressão foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando o grupo *naïve* (animais não manipulados) como condição calibradora. Os dados de RT-qPCR foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey (*Statistica 7.0*). Para a construção dos gráficos de expressão, foi utilizado o programa *GraphPad Prism 3* (*GraphPad Software, Inc.*). As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas quando as variações de expressão gênica mostraram-se superiores a 1,5 vezes e o $P < 0,05$. As análises e a nomenclatura utilizadas neste trabalho foram baseadas nas recomendações do MIQE guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009).

5. RESULTADOS

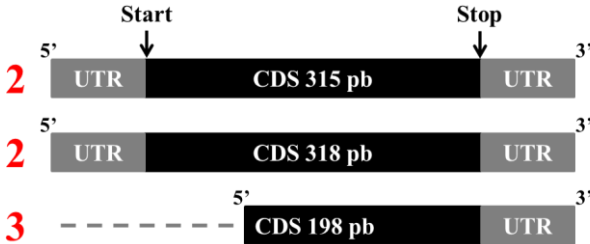
5.1. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS CODIFICANTES PARA STYLICINAS NO CAMARÃO *L. vannamei*

A identificação de sequências codificantes para stylicinas no camarão *L. vannamei* foi realizada por meio de buscas em bancos de dados públicos (tBLASTx do NCBI) utilizando-se como *query* sequências anotadas de stylicinas em outras espécies de camarões peneídeos: *L. stylirostris* (*Ls-Stylicin1* e *Ls-Stylicin2*) e *M. japonicus* (*Mj-sty*). Nessa busca, 14 sequências de EST não anotadas de *L. vannamei* com homologia a stylicinas foram identificadas, pertencentes a bibliotecas de bancos transcriptômicos de: **(1) hemócitos** (GenBank: CK591498; CV468241; CK591516; CK591492; BE188619; BE188495; BE188497; FE124653; FE125173), **(2) brânquias** (Genbank: FE079794; FE079795), **(3) órgão linfoide** (Genbank: FE156584; FE156583) e **(4) cordão nervoso** (Genbank: FE179060).

Dentre as EST identificadas, sete delas (GenBank: BE188495; FE156584; BE188497; FE079794; FE079795; CK591498; BE188619) não foram consideradas nas análises subsequentes por mostrarem problemas evidentes de sequenciamento (alto conteúdo “n” na sequência). Das sete sequências restantes, quatro apresentaram a região codificadora (CDS ou *Coding Sequence*) completa e três apenas a região 3’ da CDS. De maneira interessante, as duas sequências completas identificadas nos bancos transcriptômicos de hemócitos (GenBank: FE124653; FE125173) apresentaram uma CDS contendo 315 pb, enquanto que as sequências identificadas nos bancos transcriptômicos de cordão nervoso (Genbank: FE179060) e órgão linfoide (Genbank: FE156583) apresentaram uma CDS contendo 318 pb. Todas as sequências incompletas foram identificadas em bancos transcriptômicos de hemócitos (GenBank: CV468241; CK591516; CK591492) e apresentaram uma CDS de 198 pb (**Figura 6**).

As sequências nucleotídicas da CDS das stylicinas identificadas foram alinhadas com as respectivas sequências das stylicinas de *L. stylirostris* e *M. japonicus* (**Figura 7A**). O cladograma resultante da análise do alinhamento nucleotídico somente das regiões comuns a todas essas sequências sugere a existência de pelo menos dois diferentes grupos de stylicinas em *L. vannamei*, assim como descrito para o camarão *L. stylirostris* (**Figura 7B**). Todas as quatro sequências com a CDS completa formaram um mesmo clado com a sequência *Ls-Stylicin1*

Figura 6. Estruturas das regiões codificadoras de stylicinas das seqüências analisadas.



Em vermelho: Quantidade de seqüências que apresentaram o modelo seguinte. UTR: Região não traduzida; CDS: Região codificadora; Start: Códono de iniciação; Stop: Códono de terminação.

enquanto que as três seqüências incompletas agruparam-se com *Ls-Stylicin2*. A seqüência *Mj-sty* do camarão *M. japonicus* formou um grupo distinto das stylicinas de *L. vannamei* e *L. stylirostris* (**Figura 6B**).

Figura 7. Alinhamento nucleotídico da região codificante das stylicinas de camarões peneídeos e cladograma das regiões comuns a todas as seqüências.

A

<i>L. vannamei</i> [FE124653]	ATGAAGACCTACAGTCAGGTCTCTGTTTTTGC
<i>L. vannamei</i> [FE125173]	ATGAAGACCTACAGTCAGGTCTCTGTTTTTGC
<i>L. vannamei</i> [FE156583]	ATGAAGACCTACAGTCAGGTCTCTGTTTTTCGT
<i>L. vannamei</i> [FE179060]	ATGAAGACCTACAGTCAGGTCTCTGTTTTTGT
<i>Ls-Stylicin1</i> [EU177435]	ATGAAGACCTACAGTCGGGTCTCCGTCTTTGT
<i>L. vannamei</i> [CV468241]	-----
<i>L. vannamei</i> [CK591516]	-----
<i>L. vannamei</i> [CK591492]	-----
<i>Ls-Stylicin2</i> [EU177437]	ATGAAGACCTACAGTCGGGTCTCCGTCTTTGT
<i>Mj-sty</i> [KR063277]	ATGAAGACCTTCAGCCAGGCCTTTATTTTCGT
<i>L. vannamei</i> [FE124653]	CTTATTGGTTGCGATCGCGCACACGTCACAAG
<i>L. vannamei</i> [FE125173]	CTTATTGGTTGCGATCGCGCACACGTCACAAG
<i>L. vannamei</i> [FE156583]	CTTATTGGTTGCGATCGCGCACACGTCACAAG
<i>L. vannamei</i> [FE179060]	CTTATTGGTTGCGATCGCGCACACGTCACAAG
<i>Ls-Stylicin1</i> [EU177435]	CTTATTGGTTGCGGTCTTGCACACGTCACAAG
<i>L. vannamei</i> [CV468241]	-----
<i>L. vannamei</i> [CK591516]	-----
<i>L. vannamei</i> [CK591492]	-----
<i>Ls-Stylicin2</i> [EU177437]	CTTACTGGTTGCGATCGTGCACACGTCACAAG
<i>Mj-sty</i> [KR063277]	CCAGTTGGTTGCGATCCTGCACACTTCCCAAG

Figura 7. Alinhamento nucleotídico da região codificante das stylicinas de camarões peneídeos e cladograma das regiões comuns a todas as seqüências (continuação).

```

L. vannamei [FE124653] GATCTTCCTTTTCACCACCTAG---AGGACCT
L. vannamei [FE125173] GATCTTCCTTTTCACCACCTAG---AGGACCT
L. vannamei [FE156583] GATCTTCCTTTTCACCACCTAG---AGGACCT
L. vannamei [FE179060] GATCTTCCTTTTCACCACCTAG---AGGACCT
Ls-Stylicin1 [EU177435] GATCTTCCTTTTCACCTCCCAG---AGGACCT
L. vannamei [CV468241] -----
L. vannamei [CK591516] -----
L. vannamei [CK591492] -----
Ls-Stylicin2 [EU177437] GATCTTCCTTTGCACCACCAG---TCGACTT
Mj-sty [KR063277] GCTCTTCCTTTTCACCTGCCGCCCTCTCCG

```

```

L. vannamei [FE124653] CCGGGCTGGAACCTTCCATGCGTACCACAAGA
L. vannamei [FE125173] CCGGGCTGGAACCTTCCATGCGTACCACAAGA
L. vannamei [FE156583] CCGGGCTGGAACCTTCCATGCGTACCACAAGA
L. vannamei [FE179060] CCGGGCTGGAACCTTCCATGCGTACCACAAGA
Ls-Stylicin1 [EU177435] CCGGGCTGGGACCTCCATGCGTACAACAACC
L. vannamei [CV468241] -----CCACAAGA
L. vannamei [CK591516] -----CCACAAGA
L. vannamei [CK591492] -----CCACAAGA
Ls-Stylicin2 [EU177437] CCGGGCTGGGAACCTCCATGCGTACCGCAGCA
Mj-sty [KR063277] CCAGGCAGGAAACATCCATGCTTACCATTATC

```

```

L. vannamei [FE124653] GTGCCACC GTGCCATATGATG ---ATGAGT
L. vannamei [FE125173] GTGCCACC GTGCCATATGATG ---ATGAGT
L. vannamei [FE156583] GTGCCACC GTGCCATATGATGATTATGAGT
L. vannamei [FE179060] GTGCCACC GTGCCATATGATGATCATGAGT
Ls-Stylicin1 [EU177435] GTGCCCTAAGTGCCATATGATGATTACAAGT
L. vannamei [CV468241] GTGCCACC GTGCCATATGATG ---ATGAGT
L. vannamei [CK591516] GTGCCACC GTGCCATATGATG ---ATGAGT
L. vannamei [CK591492] GTGCCACC GTGCCATATGATG ---ATGAGT
Ls-Stylicin2 [EU177437] GTGCCACC GTGCCATATGATG ---ATGAGT
Mj-sty [KR063277] GTGCCACC GTGCCGATGAAG -----AAT

```

```

L. vannamei [FE124653] GTCCGAAGTGGGTGGATTCCGGGTGTGT CAC
L. vannamei [FE125173] GTCCGAAGTGGGTGGATTCCGGGTGTGT CAC
L. vannamei [FE156583] GTCCGAAGTGGGTGGATTCCGGGTGTGT CAC
L. vannamei [FE179060] GTCCGAAGTGGGTGGATTCCGGGTGTGT CAC
Ls-Stylicin1 [EU177435] GTCCGACGTGTGATAAAATTCGGGAGTGT ---
L. vannamei [CV468241] GTCCGAAGTGGGAGGAATTA CCGGCGTGT ---
L. vannamei [CK591516] GTCCGAAGTGGGAGGAATTA CCGGCGTGT ---
L. vannamei [CK591492] GTCCGAAGTGGGAGGAATTA CCGGCGTGT ---
Ls-Stylicin2 [EU177437] GTCCGAAGTGGGGGTTCCTTGCCTGTGT ---
Mj-sty [KR063277] GCCCGACGTGGGAGATAATTA CCAACCATGT ---

```

Figura 7. Alinhamento nucleotídico da região codificante das stylicinas de camarões peneídeos e cladograma das regiões comuns a todas as seqüências (continuação).

<i>L. vannamei</i> [FE124653]	GAGGTGTGCACCGATATTAGTATATCATGTGA
<i>L. vannamei</i> [FE125173]	GAGGTGTGCACCGATATTAGTATATCATGTGA
<i>L. vannamei</i> [FE156583]	GAGGTGTGCACCGATATTAGTATATCATGTGA
<i>L. vannamei</i> [FE179060]	GAGGTGTGCACCGATATTAGTATATCATGTGA
<i>Ls-Stylicin1</i> [EU177435]	GAGGAGTGCCCCATATTAGTATAGGATGTGA
<i>L. vannamei</i> [CV468241]	GAGGAGTGCCCCGATATTCATATAGGATGTGA
<i>L. vannamei</i> [CK591516]	GAGGAGTGCCCCGATATTCATATAGGATGTGA
<i>L. vannamei</i> [CK591492]	GAGGAGTGCCCCGATATTCATATAGGATGTGA
<i>Ls-Stylicin2</i> [EU177437]	GAGGAGTGCCCCGATATTCATATAGGATGTGA
<i>Mj-sty</i> [KR063277]	GAGCTTTGCCAGAAATTCACATCGGGTGTGA

<i>L. vannamei</i> [FE124653]	ATGCG---GCTACCATAGCTGCCAATGTCCGC
<i>L. vannamei</i> [FE125173]	ATGCG---GCTACCATAGCTGCCAATGTCCGC
<i>L. vannamei</i> [FE156583]	ATGCG---GCTACCATAGCTGCCAATGTCCGC
<i>L. vannamei</i> [FE179060]	ATGCG---GCTACCATAGCTGCCAATGTCCGC
<i>Ls-Stylicin1</i> [EU177435]	ATGCG---GCTATTTTAGCTGCCAATGTCCGA
<i>L. vannamei</i> [CV468241]	CTGCCCTTTCTACCACAGCTGCTTATGTCCGC
<i>L. vannamei</i> [CK591516]	CTGCCCTTTCTACCACAGCTGCTTATGTCCGC
<i>L. vannamei</i> [CK591492]	CTGCCCTTTCTACCACAGCTGCTTATGTCCGC
<i>Ls-Stylicin2</i> [EU177437]	CTGCCCTTTCTACCACAGCTGCTTGTGTCCGC
<i>Mj-sty</i> [KR063277]	CTGTCCCTTCCACCACAGCTGCCCTTGTGATC

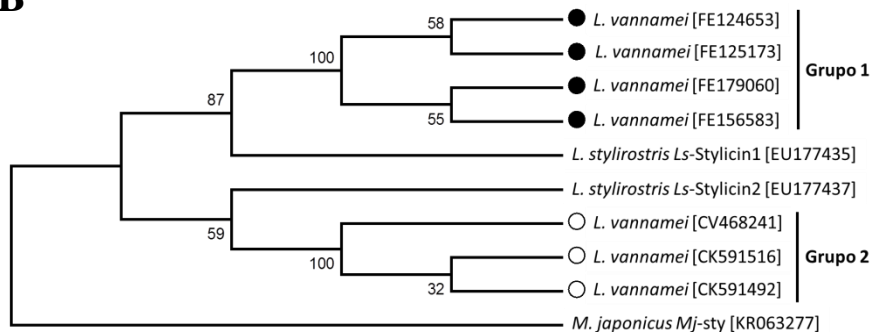
<i>L. vannamei</i> [FE124653]	GGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAAAGTCCCATC
<i>L. vannamei</i> [FE125173]	GGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAAAGTCCCATC
<i>L. vannamei</i> [FE156583]	GGCCTGTGTGTGAGCCGTGCGAAAGTCCCATC
<i>L. vannamei</i> [FE179060]	GGCCTGTGTGTGAGCCGTGCGAAAGTCCCATC
<i>Ls-Stylicin1</i> [EU177435]	AGCCTGTGTGTGAACCGTGCGAGAGTCCCATC
<i>L. vannamei</i> [CV468241]	AGCCTGTGTGTGAGCCGTGCGAAAGTCCCATC
<i>L. vannamei</i> [CK591516]	AGCCTGTGTGTGAGCCGTGCGAAAGTCCCATC
<i>L. vannamei</i> [CK591492]	AGCCTGTGTGTGAGCCGTGCGAAAGTCCCATC
<i>Ls-Stylicin2</i> [EU177437]	AGCCTGTGTGTGAACCTTGCGAGAGTCCCATC
<i>Mj-sty</i> [KR063277]	AACCTGCCGTCTCCTCCGTGCGACTTCCCTTC

<i>L. vannamei</i> [FE124653]	GCCGAGTTGATCAAAAAGGGAGGCTATAAAGG
<i>L. vannamei</i> [FE125173]	GCCGAGTTGATCAAAAAGGGAGGCTATAAAGG
<i>L. vannamei</i> [FE156583]	GCCGAGTTGATCAGAAAAGGGAGGCTATAAAGG
<i>L. vannamei</i> [FE179060]	GCCGAGTTGATCAAAAAGGGAGGCTATAAAGG
<i>Ls-Stylicin1</i> [EU177435]	GCCGAGTTGATCAAAAAGGGAGGCTATAAAGG
<i>L. vannamei</i> [CV468241]	GCCGAGTTGATCAAAAAGGGAGGCTATAAAGG
<i>L. vannamei</i> [CK591516]	GCCGAGTTGATCAAAAAGGGAGGCTATAAAGG
<i>L. vannamei</i> [CK591492]	GCCGAGTTGATCAAAAAGGGAGGCTATAAAGG
<i>Ls-Stylicin2</i> [EU177437]	GCCGAGTTAATCAAAAAGGGAGGCTATAAAGG
<i>Mj-sty</i> [KR063277]	GGCAGTTGATTAATAAGGGAGGATATAGAGG

Figura 7. Alinhamento nucleotídico da região codificante das stylicinas de camarões peneídeos e cladograma das regiões comuns a todas as seqüências (continuação).

<i>L. vannamei</i> [FE124653]	ATAA
<i>L. vannamei</i> [FE125173]	ATAA
<i>L. vannamei</i> [FE156583]	ATAA
<i>L. vannamei</i> [FE179060]	ATAA
<i>Ls-Stylicin1</i> [EU177435]	ATAA
<i>L. vannamei</i> [CV468241]	ATAA
<i>L. vannamei</i> [CK591516]	ATAA
<i>L. vannamei</i> [CK591492]	ATAA
<i>Ls-Stylicin2</i> [EU177437]	ATAA
<i>Mj-sty</i> [KR063277]	ATAA

B



A: As seqüências nucleotídicas das stylicinas de *Litopenaeus vannamei* e de espécies correlatas foram alinhadas com o programa ClustalO. Nucleotídeos idênticos a todas as seqüências estão destacados em preto enquanto que os hífens indicam *gaps*. **B:** As regiões comuns às seqüências nucleotídicas das stylicinas de *L. vannamei* e de espécies correlatas foram alinhadas com o programa ClustalO previamente à elaboração do cladograma. O cladograma foi construído utilizando o método de *Neighbor Joining* (1.000 replicatas) no programa MEGA 6.0. ● seqüências de stylicinas de *L. vannamei* agrupadas com a seqüência *Ls-Stylicin1* de *Litopenaeus stylirostris* (Grupo 1) e ○ com a seqüência *Ls-Stylicin2* de *L. stylirostris* (Grupo 2). O número de acesso no GenBank das seqüências encontra-se entre colchetes.

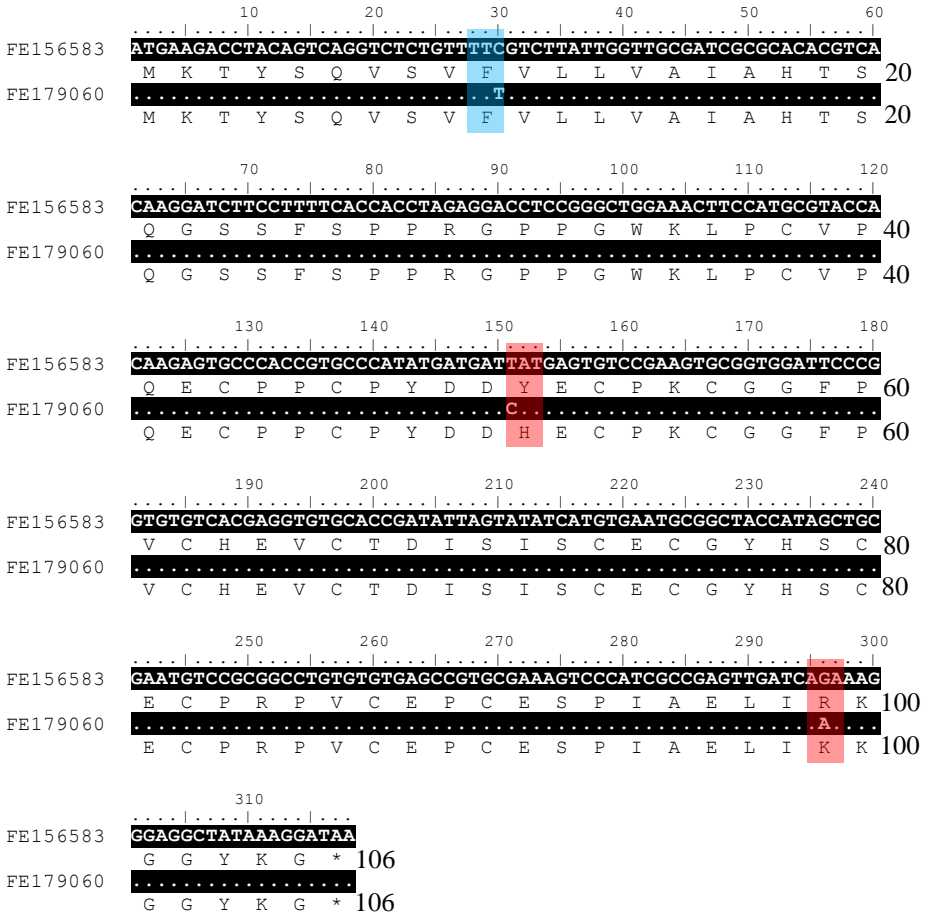
A partir dessas análises, as stylicinas identificadas em *L. vannamei* foram nomeadas conforme os critérios utilizados para a categorização de outros AMPs descritos em camarões, como as peneídeos (GUEGUEN et al., 2006) e os ALFs (ROSA et al., 2013).

Esta nomenclatura inclui: (1) o nome da espécie (indicada em itálico pelas três primeiras letras do gênero e das três primeiras letras do epíteto específico da espécie), seguido da (2) abreviação do termo “stylicina” (STY) e (3) o número de identificação do grupo (em algarismos arábicos) e, quando presente, um hífen e um número (também em algarismos arábicos) para a identificação da variante. Dessa forma, as stylicinas que compõem o Grupo 1 foram denominadas *Litvan STY1-1* (CDS de 315 pb; GenBank: FE124653, FE125173) e *Litvan STY1-2* (CDS de 318 pb; Genbank: FE156583, FE179060) e as que compõem o Grupo 2 de *Litvan STY2* (GenBank: CV468241; CK591516; CK591492).

A sequência aminoacídica deduzida das quatro stylicinas pertencentes ao Grupo 1 (CDS completa) é composta por um peptídeo sinal com 22 resíduos de aminoácidos, seguido de um peptídeo maduro contendo uma região N-terminal rica em resíduos de prolina (P) e uma região C-terminal contendo os 13 resíduos conservados de cisteína (C), característicos das stylicinas. As duas sequências de *Litvan STY1-1* mostraram a mesma constituição nucleotídica entre si (**Figura 8**). Suas sequências aminoacídicas deduzidas contêm 104 resíduos de aminoácidos. A massa molecular do peptídeo maduro das duas sequências foi calculada em 8,83 kDa, com *pI* teórico de 4,98 (moléculas aniônicas). Nenhum domínio proteico conservado foi identificado nas sequências analisadas.

Por outro lado, as duas sequências de *Litvan STY1-2* mostraram entre elas 3 diferenças nucleotídicas: 1 substituição sinônima (no nucleotídeo 30) e 2 substituições não sinônimas (nos nucleotídeos 151 e 296), que resultam em duas diferenças aminoacídicas: tirosina (Y)/histidina (H) na posição aminoacídica 51 e arginina (R)/Lisina (K) na posição aminoacídica 99 (**Figura 9**). Suas sequências aminoacídicas deduzidas contêm 105 resíduos de aminoácidos (1 resíduo a mais que as sequências *Litvan STY1-1*). O peptídeo maduro da sequência FE156583 apresentou massa molecular calculada de 9,02 kDa e *pI* teórico de 4,98 enquanto que o peptídeo maduro da sequência FE179060 apresentou massa molecular calculada de 8,97 kDa e *pI* teórico de 5,19. Nenhum domínio proteico conservado foi identificado nas sequências analisadas.

Figura 9. Alinhamento nucleotídico e aminoacídico deduzido de *Litvan* STY1-2.



Nas linhas destacadas em preto, estão as seqüências nucleotídicas e, nas linhas abaixo dessas, as seqüências aminoacídicas deduzidas correspondentes. A régua acima das seqüências indicam as posições nucleotídicas. Os números à direita das seqüências indicam a posição do último resíduo de aminoácido dessa linha. Os pontos (.) indicam identidade entre os nucleotídeos das duas seqüências. As caixas azuis destacam as diferenças nucleotídicas sinônimas enquanto que as caixas vermelhas destacam as diferenças não sinônimas. Os asteriscos (*) indicam códons de parada.

Os parâmetros bioquímicos das sequências do Grupo 1 estão apresentadas, juntamente com as stylicinas dos camarões *L. stylirostris* e *M. japonicus*, na **Tabela 1**.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos das stylicinas completas de *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* e *Marsupenaeus japonicus*.

Espécie	Anotação	GenBank	Peptídeo sinal	Peptídeo maduro		
			aa	aa	MM	pI
<i>L. vannamei</i>	<i>Litvan</i> STY1-1	FE124653	22	82	8,83 kDa	4,98
		FE125173	22	82	8,83 kDa	4,98
	<i>Litvan</i> STY1-2	FE156583	22	83	9,02 kDa	4,98
		FE179060	22	83	8,97 kDa	5,19
<i>L. stylirostris</i>	<i>Ls</i> -Stylicin1	EU177435	22	82	8,93 kDa	5,00
	<i>Ls</i> -Stylicin2	EU177437	22	82	8,91 kDa	4,74
<i>M. japonicus</i>	<i>Mj</i> -sty	KR063277	22	82	8,74 kDa	5,04

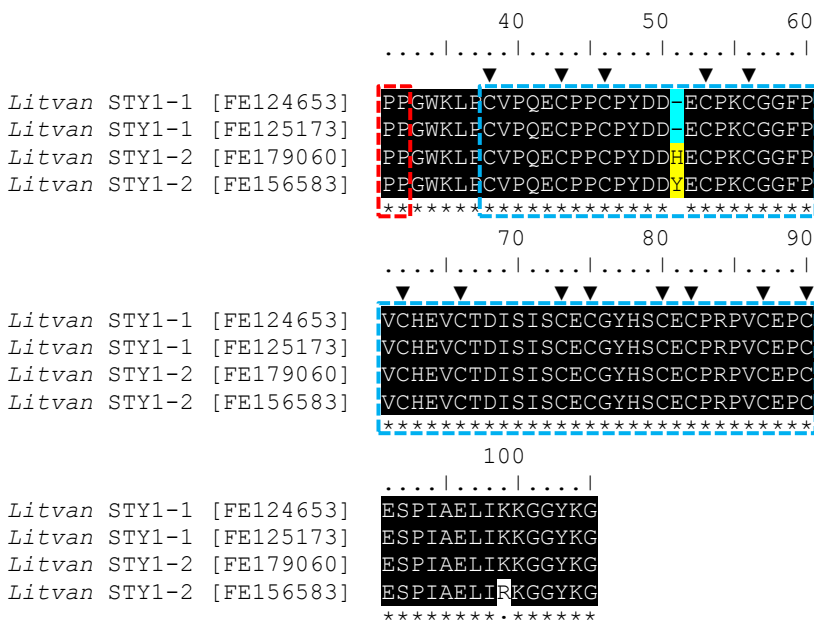
aa: número de resíduos de aminoácidos; MM: massa molecular; pI: ponto isoelétrico teórico.

As sequências *Litvan* STY1-1 e *Litvan* STY1-2 apresentam mais de 79,27% de identidade aminoacídica com *Ls*-Stylicin1, 77,78% com *Ls*-Stylicin2 e 55% com *Mj*-sty. As sequências aminoacídicas deduzidas do Grupo 1 de *L. vannamei* foram alinhadas e comparadas (**Figura 10**). Algumas diferenças intraespecíficas entre essas sequências foram identificadas e destacadas no alinhamento. Na posição 11 do peptídeo sinal, encontra-se nas sequências de *Litvan* STY1-1 um resíduo de alanina (A) enquanto que nas sequências *Litvan* STY1-2, um resíduo de valina (V). Na posição 51, *Litvan* STY1-2 apresentam um resíduo de aminoácido a mais que as sequências *Litvan* STY1-1 [histidina (H) ou tirosina (Y)].

Figura 10. Alinhamento aminoacídico das stylicinas do Grupo 1 de *Litopenaeus vannamei*.

	10	20	30
<i>Litvan</i> STY1-1 [FE124653]	MKTYSQVSVEA	LLVAIAHTSQGSSFSPPRG	
<i>Litvan</i> STY1-1 [FE125173]	MKTYSQVSVEA	LLVAIAHTSQGSSFSPPRG	
<i>Litvan</i> STY1-2 [FE179060]	MKTYSQVSVEV	LLVAIAHTSQGSSFSPPRG	
<i>Litvan</i> STY1-2 [FE156583]	MKTYSQVSVEV	LLVAIAHTSQGSSFSPPRG	
	*****	*****	*****

Figura 10. Alinhamento aminoacídico das stylicinas do Grupo 1 de *Litopenaeus vannamei* (continuação).



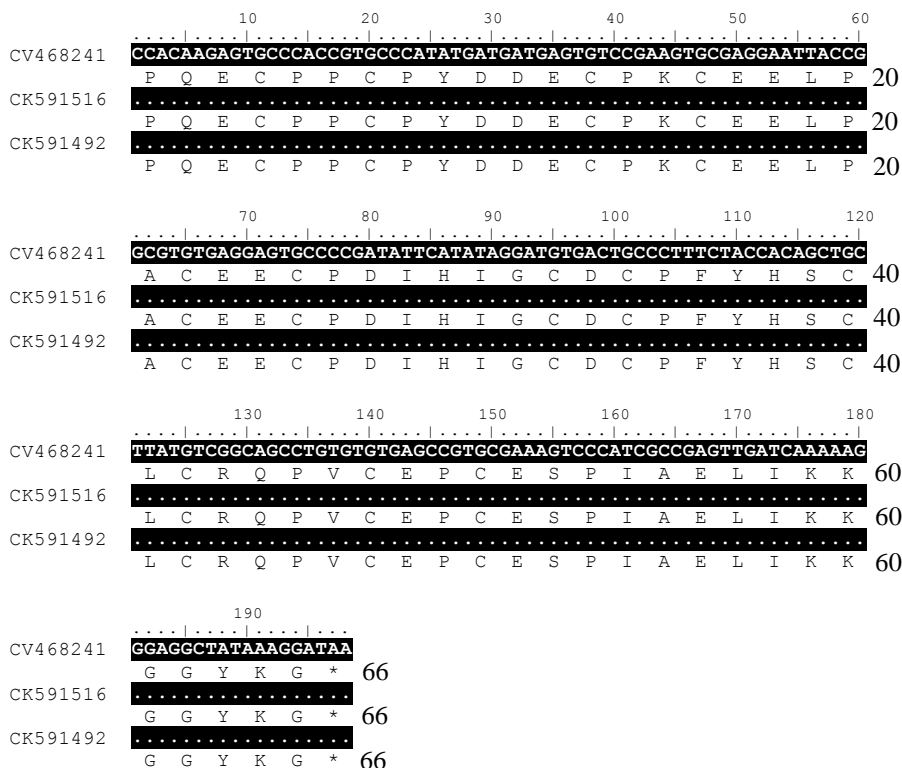
Resíduos idênticos a todas as sequências estão destacados em preto e indicados, na linha inferior, por asterisco (*). Resíduos específicos das sequências de *Litvan* STY1-1 estão destacados na cor azul e os de *Litvan* STY1-2 estão destacados na cor amarela. Os hífens indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:): resíduos pouco e muito similares, respectivamente. A caixa pontilhada em azul indica o peptídeo sinal enquanto que a caixa pontilhada em vermelho indica a região contendo resíduos de prolina. O símbolo ▼ indica os 13 resíduos conservados de cisteína.

Em relação às stylicinas do Grupo 2, foram identificadas apenas sequências com a CDS incompleta (região 3'). As três sequências de *Litvan* STY2 mostraram a mesma constituição nucleotídica (**Figura 11**). Assim como para *Litvan* STY1, nenhum domínio proteico conservado foi identificado nessas sequências. Essas sequências (correspondentes à região C-terminal dos peptídeos) mostraram 93,85% de identidade aminoacídica com a mesma região C-terminal de *Ls*-Stylicin2 e 71,88% e 68,75% com as sequências *Ls*-Stylicin1 e *Mj*-sty, respectivamente.

Todas as sequências de stylicinas identificadas em *L.vannamei* foram traduzidas e alinhadas para se analisar as diferenças intraespecíficas entre os Grupos 1 e 2. Apenas na região C-terminal

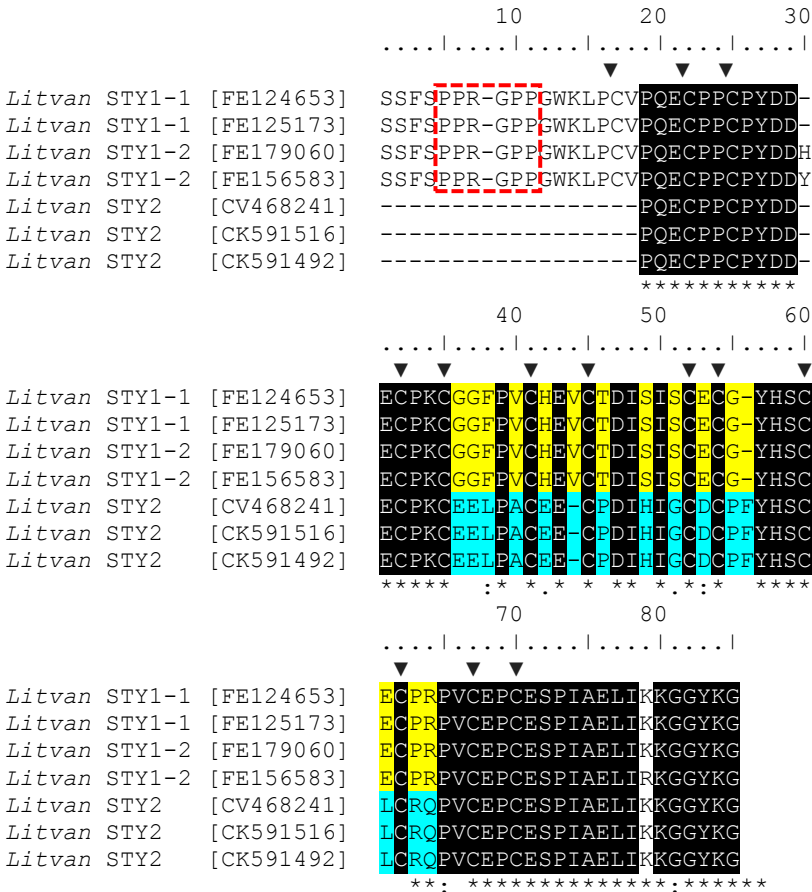
(comum a todas as seqüências), foram identificados 15 resíduos aminoacídicos diferentes entre as *Litvan STY1* (*Litvan STY1-1* e *Litvan STY1-2*) e as *Litvan STY2*, as quais encontram-se destacadas na **Figura 12**. Além dessas diferenças aminoacídicas, na posição 49 um resíduo de valina (V) presente em *Litvan STY2* não está presente em *Litvan STY1*, enquanto que na posição 56, um resíduo de fenilalanina (F), presente em *Litvan STY1*, não está presente em *Litvan STY2*.

Figura 11. Alinhamento nucleotídico e aminoacídico deduzido de seqüências incompletas de *Litvan STY2*.



Nas linhas destacadas em preto, estão as seqüências nucleotídicas e, nas linhas abaixo dessas, as seqüências aminoacídicas deduzidas correspondentes. A régua acima das seqüências indicam as posições nucleotídicas. Os números à direita das seqüências indicam a posição do último resíduo de aminoácido dessa linha. Os pontos (.) indicam identidade entre os nucleotídeos das duas seqüências, enquanto que os asteriscos (*) indicam códons de parada.

Figura 12. Alinhamento das seqüências aminoacídicas deduzidas das stylicinas (sem peptídeo sinal) dos Grupos 1 e 2 de *Litopenaeus vannamei*.

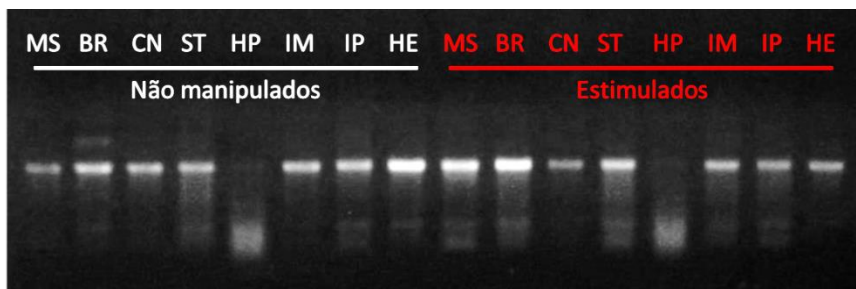


Resíduos idênticos a todas as seqüências estão destacados em preto e indicados, na linha inferior, por asterisco (*). Destacadas em azul e amarelo estão as diferenças intraespecíficas entre as seqüências completas (*Litvan* STY1-1 e *Litvan* STY1-2) e as seqüências parciais (*Litvan* STY2) identificadas em *L. vannamei*, respectivamente. Os hífen indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:.) resíduos pouco e muito similares, respectivamente. Caixa vermelha: região contendo resíduos de prolina e o símbolo ▼ os 13 resíduos conservados de cisteína.

5.2. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A distribuição da expressão gênica de stylicinas foi avaliada de forma semi-quantitativa (RT-PCR convencional) em oito tecidos/órgãos (estômago, hepatopâncreas, intestino médio, intestino posterior, hemócitos, músculo, brânquias e cordão nervoso) de animais estimulados ou não com a bactéria *V. harveyi* ATCC 14126 (inativadas por calor). Inicialmente, o perfil de migração do RNA total das diferentes amostras foi avaliado em gel de agarose. Foi possível visualizar a presença de bandas correspondentes aos diferentes tipos de RNA ribossomal. Apesar de as amostras terem apresentado padrões distintos de migração e abundância dos diferentes tipos de RNA ribossomal (como exemplificado pelas amostras de hepatopâncreas), nenhum sinal evidente de degradação foi identificado (**Figura 13**). Além disso, a amplificação de transcritos de β -actina mostrou-se estável em todas as amostras, validando assim as comparações de expressão das stylicinas entre os grupos experimentais (**Figura 14**).

Figura 13. Perfil de migração do RNA total das amostras (*pools* de 3 camarões) dos oito tecidos/órgãos das duas condições experimentais (não manipulados e estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126).

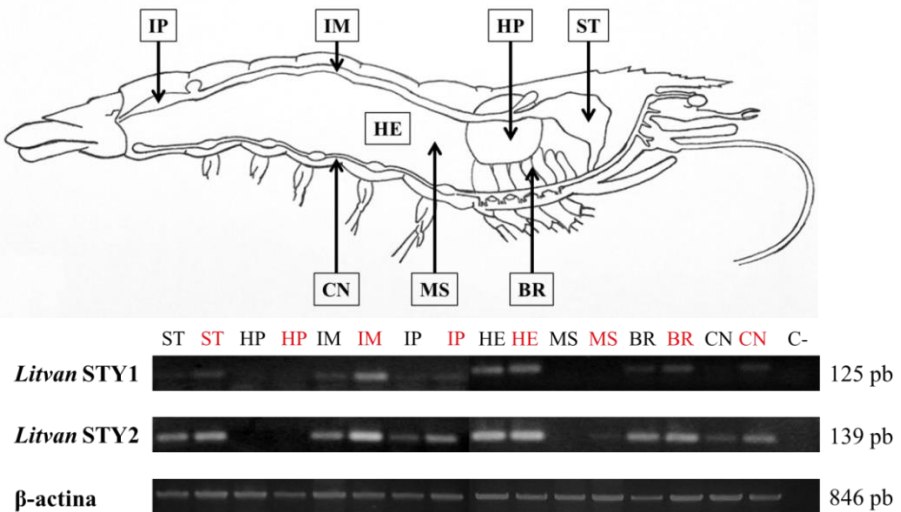


MS: Músculo, BR: Brânquias, CN: Cordão nervoso, ST: Estômago, HP: Hepatopâncreas, IM: Intestino médio, IP: Intestino posterior, HE: Hemócitos.

Para as análises de expressão, foram utilizados iniciadores específicos para os dois grupos de stylicinas de *L. vannamei*, *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2. Transcritos de *Litvan* STY1 foram identificados no estômago, intestinos médio e posterior, hemócitos e brânquias de camarões não manipulados (grupo *naïve*) (**Figura 14**). Em camarões estimulados, observou-se um aumento de transcritos no estômago,

intestino médio e brânquias. No cordão nervoso, transcritos de *Litvan* STY1 foram detectados somente em animais após o desafio bacteriano (**Figura 14**). Transcritos de *Litvan* STY2 foram identificados no estômago, intestinos médio e posterior, hemócitos, brânquias e cordão nervoso de camarões do grupo *naïve* (**Figura 14**). Em animais estimulados, observou-se um aumento de transcritos nos intestinos médio e posterior e também no cordão nervoso. No músculo, transcritos de *Litvan* STY2 foram detectados somente em animais após o desafio microbiano (**Figura 14**).

Figura 14. Análise semi-quantitativa da distribuição da expressão de stylicinas em oito tecidos/órgãos de camarões após 48 h de um estímulo microbiano em comparação a animais não estimulados.

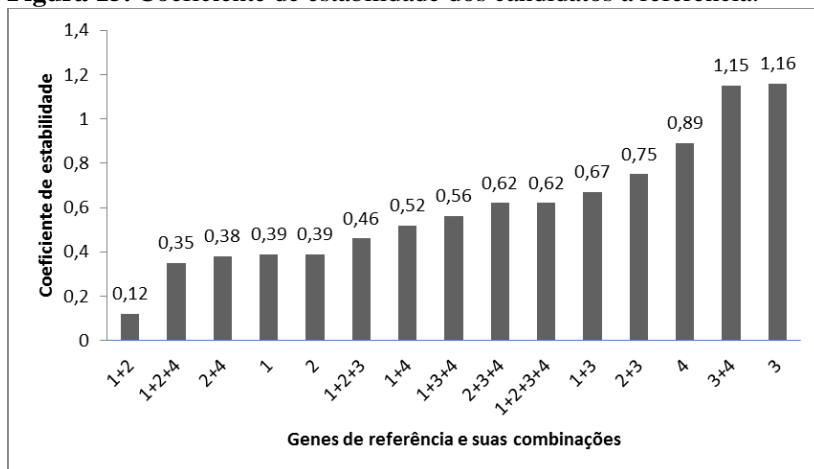


A esquema ilustrativo de um camarão mostrando a posição anatômica dos órgãos/tecidos estudados. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo mostrando a amplificação dos transcritos das stylicinas *Litvan* STY1 (125 pb) e *Litvan* STY2 (139 pb) e da β-actina (846 pb), utilizada como controle endógeno. ST: Estômago, HP: Hepatopâncreas, IM: Intestino médio, IP: Intestino posterior, HE: Hemócitos, MS: Músculo, BR: Brânquias, CN: Cordão nervoso, C-: Controle negativo. Escrito em preto: grupo *naïve* (animais não manipulados); Escrito em vermelho: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (inativada por calor).

5.3. PERFIL TRANSCRICIONAL DE STYLICINAS FRENTE A INFECÇÕES VIRAIS E BACTERIANAS

Os níveis de expressão gênica de *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2 foram avaliados nos hemócitos de camarões 48 h após infecções experimentais com o WSSV ou com a bactéria *V. harveyi* ATCC 14126. Primeiramente, foi realizada a escolha da melhor referência para os cálculos de expressão relativa. Para isso, a expressão de quatro genes candidatos foi avaliada: a do Fator de alongação 1 α (*LvEF1 α*) e de três proteínas ribossomais (*LvRpL40*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*). A análise para a escolha da melhor referência levou em consideração o coeficiente de estabilidade dos valores de Cq, calculado pelo programa RefFinder. A condição que apresentou a menor variação de expressão foi média geométrica dos genes *LvEF1 α* e *LvRpL40*, obtida pelo algoritmo *BestKeeper* (um dos quatro algoritmos utilizados pelo RefFinder) (**Figura 15**).

Figura 15. Coeficiente de estabilidade dos candidatos a referência.



Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes e da média geométrica de suas diferentes combinações. 1: *LvEF1 α* ; 2: *LvRpL40*; 3: *LvRpS6*; 4: *LvRpS3A*.

Em seguida, foi avaliada a especificidade e a eficiência dos iniciadores específicos para as duas stylicinas de *L. vannamei*. As análises de curva de dissociação mostraram que ambos os pares de iniciadores geraram um único pico (*Litvan* STY1 Tm = 80,37°C; *Litvan*

STY2 $T_m = 81,09^\circ\text{C}$), indicando a amplificação de uma única sequência e confirmando a especificidade dos dois pares de iniciadores (**Figura 16A**). Os iniciadores utilizados para a amplificação de *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2 apresentaram eficiência de 98,96% e 97,10%, respectivamente (**Figura 16B**).

Em relação à infecção viral, não foram observadas diferenças nos níveis de expressão gênica de *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2 nos hemócitos de camarões 48 h após uma infecção com o WSSV (W+) quando comparados com animais injetados com inóculo livre do vírus (W-) ou com animais não manipulados (N ou grupo *naïve*) (**Figura 17**).

Em relação à infecção bacteriana, enquanto não foram observadas diferenças nos níveis dos transcritos de *Litvan* STY1, os níveis de expressão de *Litvan* STY2 aumentaram 1,83 vezes ($P < 0,05$) no grupo infectado (V+) em comparação a animais injetados com água do mar estéril (V-) (**Figura 18**). Em relação ao grupo *naïve* (N), foi observado um aumento de 2,24 vezes ($P < 0,05$). Nenhuma diferença de expressão foi observada entre os controles experimentais (N×V-) (**Figura 18**).

Figura 16. Curvas de dissociação das reações de RT-qPCR e eficiência dos iniciadores utilizados para a amplificação de *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2.

A

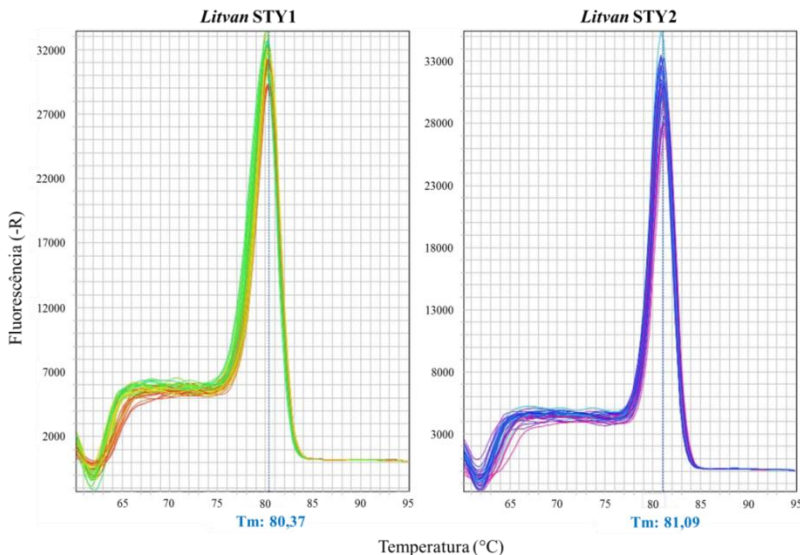
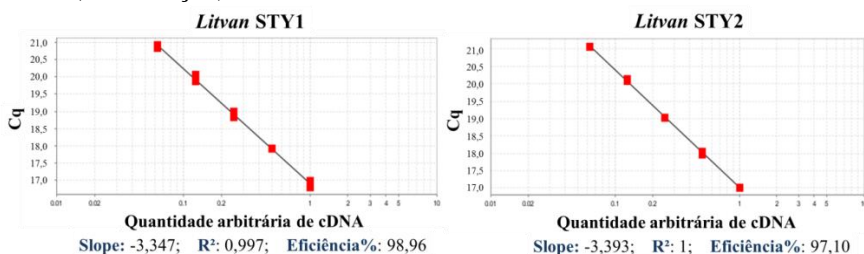
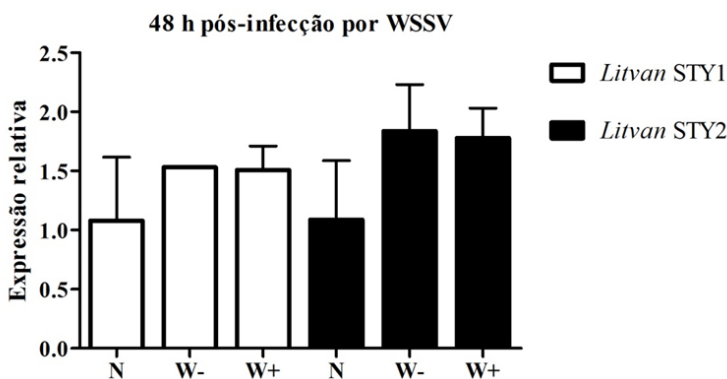


Figura 16. Curvas de dissociação das reações de RT-qPCR e eficiência dos iniciadores utilizados para a amplificação de *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2 (continuação).



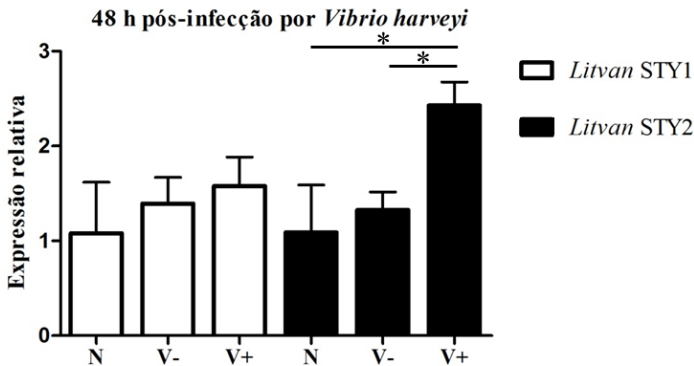
A: Perfil derivado da curva de dissociação dos produtos de RT-qPCR dos iniciadores utilizados para a amplificação dos transcritos das stylicinas *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2. Tm: Temperatura de desnaturação (*melting temperature*).
B: Curva linear resultante da amplificação das duas sequências de interesse (*Litvan* STY1 e *Litvan* STY2) utilizando-se diluições seriadas (curva padrão: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) de um *pool* de todos os cDNAs de amostras de hemócitos das infecções virais e bacterianas. A eficiência (%) dos pares de iniciadores foi calculada segundo a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

Figura 17. Perfil de expressão gênica das stylicinas *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2 nos hemócitos de *Litopenaeus vannamei* após 48 h de uma infecção experimental com o vírus da Síndrome da Macha Branca (WSSV).



Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de triplicatas biológicas (3 *pools* de 5 animais por condição). As barras brancas indicam os níveis de expressão de *Litvan* STY1 e as barras pretas de *Litvan* STY2. N: grupo *naïve* (animais não manipulados); W-: animais injetados com inóculo livre de WSSV; W+: animais infectados com WSSV (3×10^2 cópias genômicas/animal).

Figura 18. Perfil de expressão gênica das stylicinas *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2 nos hemócitos de *Litopenaeus vannamei* após 48 h de uma infecção experimental com a bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi*.



Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de triplicatas biológicas (3 *pools* de 5 animais por condição). As barras brancas indicam os níveis de expressão de *Litvan* STY1 e as barras pretas de *Litvan* STY2. Asteriscos (*): diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$), obtidas pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey. N: grupo *naïve* (animais não manipulados); V-: animais injetados com água do mar estéril; V+: animais infectados com *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (6×10^7 CFU/animal).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram caracterizadas pela primeira vez as stylicinas do camarão *Litopenaeus vannamei* e mostrado que essas formam uma família diversa de AAMPs tanto em termos de sequência primária quanto em propriedades bioquímicas e expressão gênica. Todas as sequências identificadas e caracterizadas de *L. vannamei* possuem as assinaturas de stylicinas, ou seja, uma região N-terminal contendo resíduos de prolina e uma C-terminal contendo 13 resíduos de cisteínas (LIU et al., 2015; ROLLAND et al., 2010).

Foi proposto uma nomenclatura às stylicinas, como adotada em outras famílias de AMPs de peneídeos, como as peneíginas e os ALF (GUEGUEN et al., 2006; ROSA et al., 2013). Padronizar as nomenclaturas é recomendado para que não haja uma terminologia confusa, principalmente em moléculas muito diversas como os AMPs.

Os novos AAMPs identificados em *L. vannamei* se organizam em dois clados, agrupados com as stylicinas de *L. stylirostris*, aqui nomeados Grupo 1 e 2, e distintos da stylicina caracterizada em *M. japonicus* (*Mj-sty*). Sendo assim, provavelmente um ancestral comum a essas espécies do gênero *Litopenaeus* possuía os dois grupos de stylicinas. A elevada identidade dos peptídeos sinal e da região 3' somada às diferenças aminoacídicas observadas entre *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2 sugere que os dois grupos possam ser codificados por genes distintos originados por paralogia de um gene ancestral. Neste caso, um gene ancestral de stylicina do gênero *Litopenaeus* teria sofrido duplicação e cada cópia teria sofrido pressões evolutivas diferentes gerando os distintos grupos de sequências. Um importante ponto a ser estudado agora é a organização genômica das stylicinas nesses camarões. A presença desses dois grupos de sequências coincide com a distribuição geográfica dessas espécies pelos oceanos. Os camarões *L. vannamei* e *L. stylirostris* possuem distribuição próxima, sendo ambos naturais da costa do Pacífico da América Central e do Sul, enquanto os camarões da espécie *M. japonicus* são originalmente distribuídos nos oceanos Índico e Pacífico sudoeste, entre o Japão e a Austrália (HOLTHUIS, 1980). Tais relações refletem a distribuição filogeográfica e evolução nessas populações.

As variações genéticas entre indivíduos (os polimorfismos) geralmente são derivadas de alterações em um único nucleotídeo, de ponto, ou *single nucleotide polymorphism* (SNP) (COLLINS, 1997). As sequências de *Litvan* STY1-2 possuem algumas alterações pontuais (mutações), tanto sinônima (na posição 30) e não sinônimas (nas

posições 151 e 296). Na posição 30, os dois possíveis códon codificam o mesmo aminoácido, a fenilalanina (F) e sendo assim não modificam a carga final da proteína. Essa modificação, caso não seja confirmada como um erro de sequenciamento, pode designar a presença de dois alelos. Na posição 151, a modificação resulta na codificação de uma histidina (H), na sequência Genbank: FE156583, ou de uma tirosina (Y), na sequência Genbank: FE179060. A histidina por ser um aminoácido básico, eleva o *pI* teórico e deixa a molécula mais positiva, enquanto a tirosina, por ser um aminoácido neutro não influencia na carga final da molécula. Na posição 296, a modificação resulta na codificação de uma lisina (K) na sequência Genbank: FE156583 ou de uma arginina (R) na sequência Genbank: FE179060. Ambos são aminoácidos básicos e contribuem para carga final da molécula elevando o *pI* teórico da molécula. Há também uma alteração não sinônima entre as sequências *Litvan* STY1-1 e *Litvan* STY1-2 (na posição 32). Nesta posição, nas *Litvan* STY1-1 a modificação codificará uma alanina (Ala) enquanto nas *Litvan* STY1-2 codificará uma valina (Val). Ambos são aminoácidos neutros e não contribuem na carga da proteína. Todas as sequências de ambos os grupos de stylicinas (transcritos e genes) devem ser clonadas e sequenciadas para conferir suas vericidades e existência de alelismos.

Enquanto as sequências do peptídeo maduro de stylicinas de *Litvan* STY1 possuem 11 resíduos de aminoácidos negativamente carregados e 7 positivos, a região 3' da CDS de *Litvan* STY2 possui 13 resíduos carregados negativamente e 5 positivos indicando que elas podem ser mais aniônicas. Essa variação, ainda que pouca, de carga da molécula deve ser mais estudada, pois a interação entre o AMP e o microorganismos e a atividade biológica desses grupos podem divergir. Fenômenos de alteração da carga de AMPs na resposta imune foram observados em fragmentos sintéticos da defensina do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (MGD-1) (ROMESTAND et al., 2003).

Os grupos de stylicinas, *Litvan* STY1 e *Litvan* STY2, são diferencialmente transcritos, constitutivamente expressos em diversos órgãos e possivelmente modulados por componentes estruturais de bactérias Gram-negativas. Foi realizada a imunolocalização das stylicinas para responder a hipótese de que as stylicinas seriam transcritas apenas em hemócitos, como comprovado para outros AMPs de camarões (peneidinas e o ALFPm3) (DESTOUMIEUX et al., 2000; SOMBOONWIWAT et al., 2008). Utilizou-se anticorpos primários policlonais para a *Ls*-Stylicin1 de *L. stylirostris* (ROLLAND et al., 2010) em cortes longitudinais e transversais de abdome de *L. vannamei* (APÊNDICE A). As análises de imunohistoquímica sugerem que o

AMP stylicina é produzido apenas nos hemócitos infiltrantes no abdome do camarão, indicando que essas células devem ser os únicos sítios de produção dessas moléculas. Além de hemócitos solitários, muitos agrupamentos hemocitários foram identificados. Esse perfil é comum e bem descrito em análises dessa técnica em camarões (DESTOUMIEUX et al., 2000; MUÑOZ et al., 2002). Contudo, o abdome não contém diversos órgãos analisados na distribuição tecidual. É necessário agora realizar a mesma técnica em cortes da região do cefalotórax para se certificar que não há outro órgão que expresse stylicinas. A etapa seguinte será analisar também em qual população hemocitária essa molécula é transcrita e traduzida, sua localização intracelular e colocalização de stylicinas com outros AMPs para estudar futuramente os seus efeitos sinérgicos.

Prover o repertório de respostas moleculares derivadas de infecções é essencial para desenvolver estratégias que previnam a mortalidade relacionada a doenças infecciosas no cultivo em fazendas de carcinicultura. Não foram observadas diferenças nos níveis dos transcritos de *Litvan-STY1* e *Litvan-STY2* após 48 h da infecção viral entre os grupos estudados. Além do mais, os perfis de expressão foram muito semelhantes entre os dois genes. O tempo para morte dos camarões por WSSV com uma dose igual à utilizada é de 72 h e sendo assim, este experimento não foi capaz de selecionar os animais que sobreviveriam à infecção e é possível que isso tenha se refletido nos resultados na falta de modulação. Em indivíduos moribundos da espécie *L. vannamei*, se observou um perfil semelhante nos níveis dos transcritos de *Litvan STY1* e *Litvan STY2* (GONCALVES et al., 2014). Em *M. japonicus*, foram realizadas análises de transcritos de stylicina em brânquias e hepatopâncreas de camarões desafiados com WSSV (LIU et al., 2015). Nas brânquias, há uma queda dos transcritos em 48 h que voltam aos níveis basais em 96 h, enquanto que no hepatopâncreas, há um aumento entre 12 e 24 h de muita presença de transcritos no órgão seguido por uma queda abrupta em 48 h com pouca restauração em 96 h (LIU et al., 2015).

Foram observadas, entretanto, diferenças nos níveis dos transcritos de *Litvan STY2* de camarões infectados com *V. harveyi*. Esse fato sugere que a injúria não foi capaz de modular os transcritos, porém a infecção sim. Essa relação é importante para se distinguir a interação molecular entre patógeno/hospedeiro da resposta à lesão causada pela agulha, sugerindo que houve o reconhecimento do microrganismo e regulação do gene. As duas stylicinas avaliadas apresentaram perfis de expressão gênica distintos, apontando possíveis diversidades funcionais.

As stylicinas de *L. vannamei* apresentaram 15 resíduos de prolina (P), aproximadamente 18% de suas composições aminoacídicas. AMPs ricos em resíduos de prolina de insetos e crustáceos apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas (BACHERE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000; BULET et al., 1999) e se acredita que seja a região rica em resíduos de prolina a envolvida com a habilidade da molécula se ligar ao LPS (GENNARO; SKERLAVAJ; ROMEO, 1989; MUÑOZ et al., 2002).

Classicamente, a atividade antimicrobiana dos AMPs foi descrita apenas pela interação eletrostática entre a molécula (catiônica) e a membrana de microrganismos (com fosfolipídeos carregados negativamente), gerando poros e levando ao extravasamento do conteúdo intracelular. Atualmente, em diversos AAMPs foram identificadas atividades antimicrobianas (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2001). As stylicinas apresentam atividades majoritariamente antifúngicas e se sugere que seja por uma possível ligação à β -1,3-glicana presente na parede de fungos (ROLLAND et al., 2010). A atividade antifúngica em geral de AMPs parece estar ligada à conformação espacial e à composição muito mais que a carga das moléculas. Diversos AMPs ricos em cisteínas foram caracterizados por serem antifúngicos, como as drosomicinas da mosca-da-frutira *Drosophila melanogaster* (FEHLBAUM et al., 1994) e as defensinas de plantas (OSBORN et al., 1995; TERRAS et al., 1992). As stylicinas são moléculas ricas em resíduos de cisteínas (C), representando quase 16% de suas composições aminoacídicas. Em uma defensina da flor do tabaco (que possui oito resíduos de cisteína arranajados em quatro pontes de dissulfeto), o rompimento das pontes dissulfeto causa perda total da atividade contra os fungos (VAN DER WEERDEN; LAY; ANDERSON, 2008). A elucidação das estruturas tridimensionais das stylicinas irá contribuir para esclarecer suas interações com microrganismos.

Testes *in vitro*, apesar de essenciais podem não refletir a real função da molécula *in vivo*. Técnicas como o RNAi vêm sendo utilizadas para confirmar a importância dos AMPs no controle de infecções e demonstrar funções mais complexas dessas moléculas na resposta imune dos camarões (DE LA VEGA et al., 2008; PONPRATEEP et al., 2012). A crustina do Tipo II, por exemplo, se mostrou importante na resistência de indivíduos das espécies *L. vannamei* e *M. japonicus* a infecção com *V. penaeicida in vivo*, apesar de não ser ativa contra bactérias Gram-negativas *in vitro* (HIPOLITO et al., 2014; SHOCKEY et al., 2009). A participação dessas moléculas

como controladoras e reguladoras da microbiota de invertebrados marinhos, como visto para o ALF $Pm3$, também foi entendida por silenciamento pós-transcricional (PONPRATEEP et al., 2012; WANG et al., 2014). Sendo assim, é importante também analisar as stylicinas *in vivo* por silenciamento gênico para entender outras possíveis atividades biológicas.

Para a aquicultura, o esclarecimento sobre os peptídeos antimicrobianos pode otimizar a prevenção das doenças por seleção de animais resistentes (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016). Essas moléculas possuem vantagens sobre os antibióticos, regularmente usados na aquicultura (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016) por serem menos estáveis na natureza, por combinarem diferentes mecanismos de ação antimicrobiana, não aumentarem níveis mutacionais de bactérias e suas atividades estarem ligadas a suas propriedades imunorregulatórias, das quais os microrganismos não podem desenvolver mecanismos simples de resistência (HANCOCK; NIJNIK; PHILPOTT, 2012). Além do mais, diversas assinaturas da expressão de AMPs foram identificadas associando o número de cópias de transcritos e susceptibilidade a doenças importantes na aquicultura (DE LORGERIL et al., 2005, 2008; GONCALVES et al., 2014). Essas assinaturas podem servir no futuro como marcadores moleculares para seleção de animais procriadores em cultivos. Estudos sobre AMPs atraem também o interesse de indústrias biofarmacêuticas devido às suas atividades imunorregulatórias, modulatórias a respostas inflamatórias e alteração de membranas celulares de células tumorais (HILCHIE; WUERTH; HANCOCK, 2013; LIN et al., 2010a, 2010b). Ainda assim, pouco se sabe sobre essas moléculas e se necessita de mais esforços de pesquisa para elucidar as capacidades desses complexos efetores.

7. PRINCIPAIS RESULTADOS

- Confirmou-se a existência de stylicinas no camarão *Litopenaeus vannamei* e se concluiu que essas formam uma família diversa de peptídeos antimicrobianos aniônicos (AAMPs) em camarões.

- As stylicinas de *L. vannamei* estão divididas em, pelo menos, dois principais grupos (Grupo 1: *Litvan* STY1-1 e *Litvan* STY1-2; Grupo 2: *Litvan* STY2) com sequências e propriedades bioquímicas distintas.

- A expressão dos dois grupos de stylicinas foi detectada em diversos órgãos do camarão, mas essa distribuição parece ser o resultado da infiltração de hemócitos nos tecidos.

- A expressão desses AMPs se mostrou diferencialmente modulada nos hemócitos frente a infecções pela bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126, mas não pelo WSSV.

8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

8.1. CONCLUSÃO

- As stylicinas compreendem uma família diversa de AAMPs em *Litopenaeus vannamei*, cujos membros são expressos nos hemócitos e diferencialmente modulados frente a infecções bacterianas.

8.2. PERSPECTIVAS

- Confirmar a autenticidade das stylicinas de *L. vannamei* por clonagem molecular e sequenciamento.

- Sintetizar, em sistema recombinante, as stylicinas *L. vannamei* e avaliar suas atividades antimicrobianas *in vitro*.

- Realizar o silenciamento pós-transcricional de stylicinas e analisar suas funções biológicas *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AN, M. Y. et al. A new subfamily of penaeidin with an additional serine-rich region from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) contributes to antimicrobial and phagocytic activities. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 59, p. 186–198, 2016.
- BACHERE, E.; DESTOUMIEUX, D.; BULET, P. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: A comparison with other effectors of innate immunity. **Aquaculture**, v. 191, p. 71–88, 2000.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la inmunología del camarón. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. **Guía Práctica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. p. 237–304, 2014.
- BARTLETT, T. C. et al. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 4, n. 3, p. 278–293, 2002.
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.
- BULET, P. et al. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, n. 4-5, p. 329–344, 1999.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CADORET, J.-P. et al. Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. **FEBS Letters**, v. 460, n. 1, p. 81–85, 1999.

CARRIEL-GOMES, M. C. et al. *In vitro* antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 469–472, 2007.

CHANG, C. et al. Effect of dietary β -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 36, n. 3, p. 163–168, 1999.

CHEN, D.; HE, N.; XU, X. Mj-DWD, a double WAP domain-containing protein with antiviral relevance in *Marsupenaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 6, p. 775–781, 2008.

COLLINS, F. S. Variations on a theme: Cataloging human DNA sequence variation. **Science**, v. 278, n. 5343, p. 1580–1581, 1997.

CUTHBERTSON, B. et al. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics**, v. 54, n. 6, p. 442–445, 2002.

DE LA VEGA, E. et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1916–1925, 2008.

DE LORGERIL, J. et al. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. **Physiological Genomics**, v. 21, n. 2, p. 174–183, 2005.

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

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, p. 28398–28406, 1997.

DESTOUMIEUX, D. et al. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, n. 2, p. 335–346, 1999.

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 3, p. 461–469, 2000.

DESTOUMIEUX-GARZON, D. et al. Crustacean Immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47070–47077, 2001.

DESTOUMIEUX-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, p. 300-311, 2016.

EPAGRI. EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI). In: **Síntese Informativa da Maricultura 2015**, 2016.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); FISHERIES AND AQUACULTURE DEPARTMENT. In: **Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific**, 2004.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); FISHERIES AND AQUACULTURE DEPARTMENT. In: **The state of world fisheries and aquaculture**, 2014.

FARMER, J. J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: **The Prokaryotes**. p. 508–563, 2006..

FEHLBAUM, P. et al. Insect immunity: Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence

homology to plant antifungal peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 52, p. 33159–33163, 1994.

GENNARO, R.; SKERLAVAJ, B.; ROMEO, D. Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 10, p. 3142–3146, 1989.

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

GOUMON, Y. et al. Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids: Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29847–29856, 1998.

GROSS, P. S. et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 7, p. 565–577, 2001.

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

GUEGUEN, Y. et al. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, n. 3, p. 283–288, 2006.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. ETosis: A microbicidal mechanism beyond cell death. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, n. 1, p. 1–11, 2012.

HANCOCK, R. E. W.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D. J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 243–254, 16 mar. 2012.

HARRIS, F.; DENNISON, S.; PHOENIX, D. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, n. 6, p. 585–606, 2009.

HILCHIE, A. L.; WUERTH, K.; HANCOCK, R. E. W. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 12, p. 761–768, 2013.

HIPOLITO, S. G. et al. Role of *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide against *Vibrio penaeicida* and white spot syndrome virus infection. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 46, n. 2, p. 461–469, 2014.

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

HOLTHUIS, L. B. FAO species catalogue. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. **Fao Fisheries Synopsis**, v.1, n. 125, p. 1-261, 1980.

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

KAUTSKY, N. et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 145–161, 2000.

KAWASAKI, H.; IWAMURO, S. Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 195–205, 2008.

LAFORCE, F. M.; BOOSE, D. S. Sublethal damage of *Escherichia coli* by lung lavage. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 124, n. 6, p. 733–7, 1981.

LIN, M.-C. et al. Shrimp anti-lipopolysaccharide factor peptide enhances the antitumor activity of cisplatin in vitro and inhibits HeLa cells growth in nude mice. **Peptides**, v. 31, n. 6, p. 1019–1025, 2010a.

LIN, M.-C. et al. Antimicrobial peptide of an anti-lipopolysaccharide factor modulates of the inflammatory response in RAW264.7 cells. **Peptides**, v. 31, n. 7, p. 1262–1272, 2010b.

LIU, H. et al. Identification and expression analysis of a novel stylicin antimicrobial peptide from Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 47, n. 2, p. 817–823, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods (San Diego, CA)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MUÑOZ, M. et al. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 11, p. 2678–2689, 2002.

NG, T. H. et al. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 41, n. 4, p. 644–651, 2013.

NUNAN, L. et al. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 111, n. 1, p. 81–86, 2014.

OSBORN, R. W. et al. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. **FEBS Letters**, v. 368, n. 2, p. 257–262, 1995.

PATAT, S. A. et al. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 23-24, p. 4825–4833, 2004.

PETIT, V. W. et al. A hemocyanin-derived antimicrobial peptide from the penaeid shrimp adopts an alpha-helical structure that specifically permeabilizes fungal membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 3, p. 557–568, 2016.

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

RANGANATHAN, S. et al. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 17, n. 2, p. 106–113, 134–136, 1999.

RELF, J.; CHISHOLM, J. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 350–357, 1999.

RIEG, S. et al. Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. **British Journal of Dermatology**, v. 151, n. 3, p. 534–539, 2004.

ROLLAND, J. L. et al. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 6, p. 1269–1277, 2010.

ROMESTAND, B. et al. Key role of the loop connecting the two beta strands of mussel defensin in its antimicrobial activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 13, p. 2805–2813, 2003.

ROSA, R. D. et al. Functional divergence in shrimp anti-lipopolysaccharide factors (ALFs): From recognition of cell wall

components to antimicrobial activity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 17–19, 2013.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, n. 1, p. 262–284, 2010.

RUNGRASSAMEE, W. et al. Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 60802, 2013.

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**, v. 1858, n. 5, p. 958-970, 2015.

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.

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

SMITH, V. J. et al. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 7, p. 758–772, 2008.

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

SOMBOONWIWAT, K. et al. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 10, p. 1170–1176, 2008.

SOTO-RODRIGUEZ, S. A. et al. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 5, p. 1689–99, 2015.

SUPUNGUL, P. 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.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TASSANAKAJON, A. et al. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 639–657, 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.

TERRAS, F. R. G. et al. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 22, p. 15301–15309, 1992.

VAN DER WEERDEN, N. L.; LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14445–14452, 2008.

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

WANG, X.-W.; WANG, J.-X. Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. **Molecular Immunology**, v. 68, n. 2, p. 404–411, 2015.

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

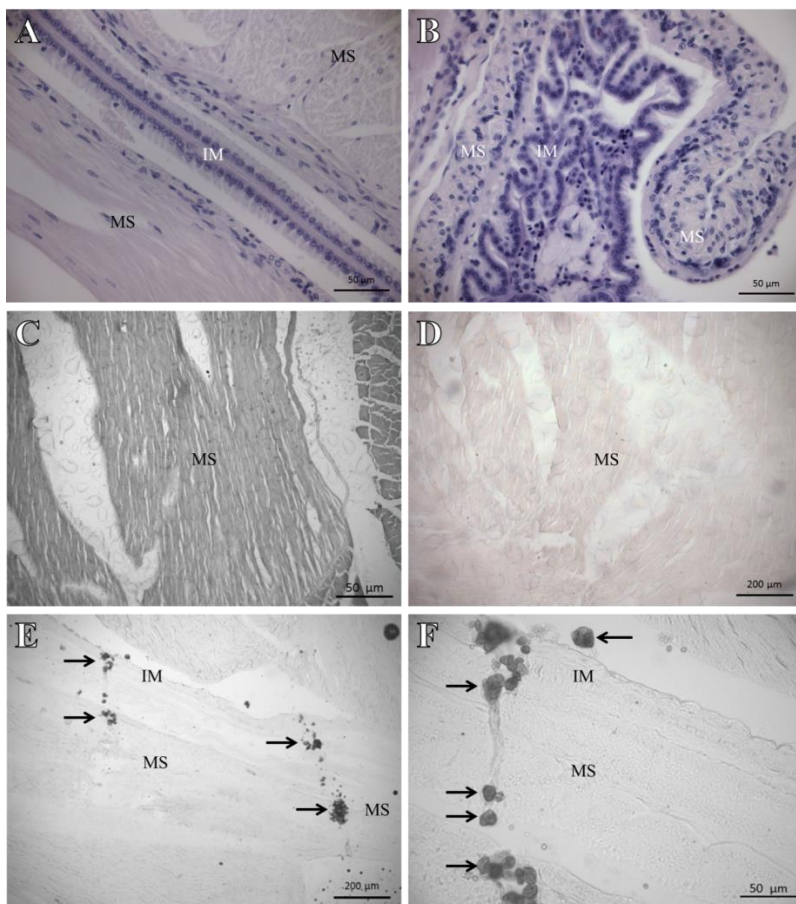
YANG, Y. et al. Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 38, p. 36859–36867, 2003.

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

YOUNT, N. Y. et al. Influence of point mutations on the flexibility of cytochrome b5: molecular dynamics simulations of holoproteins. **Biopolymers**, v. 83, n. 3, p. 297–312, 2006.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; BANAEDERAKHSHAN, R. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 2, p. 64–72, 2015.

APÊNDICE A – Imunolocalização de stylicinas em *Litopenaeus vannamei*.



Cortes longitudinais (A) e transversais (B) do abdome de camarões juvenis corados com hematoxilina-eosina. (C) Imunodeteção de actina (controle positivo da técnica) no tecido muscular abdominal. (D) Controle negativo (sem incubação com anticorpos primários). (E-F) Imunodeteção de stylicinas utilizando-se anticorpos policlonais dirigidos contra a *Ls*-Stylicin1 de *Litopenaeus stylirostris* (ROLLAND et al., 2010). Os anticorpos foram gentilmente cedidos pela Dra. Evelyne Bachère (Ifremer, França). As setas indicam células circulantes infiltradas nos tecidos. IM: Intestino médio e MS: Músculo.