

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**RAFAEL DIEGO DA ROSA**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS  
CODIFICADORAS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS  
(PAM) NAS CÉLULAS DA HEMOLINFA DE ESPÉCIES  
NATIVAS DE PENEÍDEOS MARINHOS**

Florianópolis

2007



**RAFAEL DIEGO DA ROSA**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS  
CODIFICADORAS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS  
(PAM) NAS CÉLULAS DA HEMOLINFA DE ESPÉCIES  
NATIVAS DE PENEÍDEOS MARINHOS**

Dissertação apresentada para obtenção do  
título de Mestre pelo Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia.

Orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Margherita Anna Antonia Maria Barracco

Florianópolis  
2007

**À minha mãe  
pelos sólidos ensinamentos,  
constante incentivo e amor incondicional.**

## AGRADECIMENTOS

“Se estamos atentos, Deus nos fala em nossa própria língua, qualquer que seja.”

**Mahatma Gandhi**

Meus agradecimentos sinceros a todos que, diretamente ou não, contribuíram para a elaboração desse trabalho. Em especial, gostaria de agradecer:

À minha orientadora **Dra. Margherita Barracco** pela oportunidade, orientação e confiança a mim depositada durante esses dois anos de trabalho. À **amiga Marghe** por sua grande dedicação e por seu incansável apoio e incentivo. Para mim, sempre será um grande exemplo como pessoa e como profissional, principalmente pela forma apaixonada e vibrante como se interessa pela Biologia.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura. Ao **Rogério**, por sua grande disposição em me ajudar na manutenção dos aquários e nas coletas de hemolinfa e à **Lú** pela amizade e as ótimas conversas científicas. À **Sara, Paulinha, Mirian (Rios), Pri, Nana, Dani, Cris e Andrezza** por toda a ajuda, festas, congressos e o ótimo convívio. Gostaria de agradecer em especial ao **Delano** e ao **Diego** pelo companheirismo e por sempre estarem dispostos a quebrar os maiores galhos... e é claro, por todas as cervejas, coletas, experimentos, festas da Bio e momentos engraçados!

À toda a equipe do Laboratório de Protozoologia da UFSC, em especial ao **Dr. Edmundo Grisard** pela valiosa contribuição científica e por sempre disponibilizar o seu laboratório para a execução de importantes experimentos. Gostaria de agradecer imensamente à **Pati** pela importante participação durante a minha formação em Biologia Molecular... sem sua ajuda e conselhos muito do que foi realizado não seria possível.

À **Dra. Tereza Cristina Gesteira** e ao **Pedro Alexandre Valentim** da UFCE pelas amostras de hemócitos de *F. subtilis* enviadas de Fortaleza/CE.

À equipe do Laboratório de Interação DNA-Proteína da UFSC, em especial ao **Dr. Hernán Terenzi** e ao **Dr. Javier Vernal** por possibilitarem a continuação desse trabalho.

À **Comunidade Européia** pelo apoio financeiro e à **CAPES** pela bolsa concedida.

Aos meus familiares, em especial ao meu afilhado **Lucas**, aos **meus compadres** e às (ainda) pequenas **Mariah, Eduarda** e **Sara**, por todo sorriso e afeto de sempre. Aos meus tios e primos, especialmente à **Sandrica** e ao **Tio Paulo** por serem tão especiais e presentes na minha vida. Gostaria de agradecer em especial ao **vô Chico** pela simpatia, conversas e dicas engraçadas de como se pegar um camarão pela barba... e à minha **avó Sylvia** pelo interesse, preocupação e orgulho que sempre teve pela minha formação e pelo meu trabalho.

A **TODOS** os meus amigos e amigas por todas as festas, papos, jogos, carinho e situações divertidas pelas quais passamos. Em especial... **Vivian, Amiga Cíntia, Dú, Dani, Neto, Deni, Capi, Felipe, Rodrigo, Casa, Ander, Rafa, Bê** e **família Deivid!**

À **Row, Jeans, Mah, Albert, Lilih** e **Negro** por toda amizade, amor e cumplicidade. Sem dúvida alguma a vida só tem graça porque vocês existem...

Aos meus **PAIS** pelo constante amor e incentivo. Todos os valores que trago são frutos da educação que recebi. Sempre tive e sempre terei a certeza que nenhum sonho na minha vida será inalcançável se vocês estiverem ao meu lado, como nunca deixaram de estar...

"A coisa mais bela que o homem pode  
experimental é o mistério.  
É essa emoção fundamental  
que está na raiz de toda  
ciência e toda arte."

**Albert Einstein**

## RESUMO

Proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAM) são componentes essenciais do sistema imune inato e encontram-se amplamente distribuídos entre vertebrados, invertebrados e plantas. São moléculas relativamente pequenas, de caráter anfipático e catiônico, podendo apresentar uma atividade microbicida rápida e potente contra um amplo espectro de microrganismos. Em camarões peneídeos, três classes de PAM foram isoladas e caracterizadas molecular e funcionalmente, a partir de suas células sangüíneas ou hemócitos: peneidinas (PEN), crustinas (CRUS) e os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF). O objetivo desse estudo foi o de detectar, clonar e caracterizar molecularmente seqüências semelhantes a PEN, CRUS e ALF nos hemócitos de três espécies nativas de camarões peneídeos *Farfantepenaeus paulensis*, *F. subtilis* e *Litopenaeus schmitti*, além de elaborar filogramas a partir das seqüências obtidas. Através da utilização de iniciadores desenhados a partir de regiões de consenso de seqüências disponíveis em bancos gênicos públicos, foi possível amplificar fragmentos de cDNA correspondentes às três classes de PAM acima mencionadas nos diferentes peneídeos. Em *F. subtilis* foi clonada uma seqüência semelhante à PEN do subgrupo 2 denominada de *Farsub* PEN2-1 (GenBank: EF450742), codificando para um peptídeo maduro de 54 aminoácidos, altamente catiônico e com alta identidade aminoacídica com as PEN2 de *F. paulensis* (91-93%). Em *L. schmitti*, mas não nos outros peneídeos, foi possível obter um produto de amplificação correspondendo a uma seqüência de ALF, cujo peptídeo maduro consiste de 98 aminoácidos, com similaridades aminoacídicas de 93 e 95% com *F. chinensis* e *L. vannamei*, respectivamente. Esta seqüência, denominada *Litsch* ALF (GenBank: DQ991357) codifica para uma molécula altamente catiônica e contém, assim como outras seqüências de ALF, uma região anfipática entre dois resíduos conservados de cisteína. Já, seqüências similares a CRUS foram obtidas nas três espécies de peneídeos analisados, sendo denominadas de *Farsub* CRUS (127 aminoácidos, GenBank: EF450744), *Farpau* CRUS (150 aminoácidos, GenBank: EF182747) e *Litsch* CRUS (148 aminoácidos, GenBank: EF182748). As três seqüências codificam para peptídeos contendo uma região N-terminal hidrofóbica rica em resíduos de glicina e uma região C-terminal com doze resíduos conservados de cisteína, onde se encontra um domínio WAP. Todas as seqüências de CRUS obtidas apresentaram alta similaridade aminoacídica com as diferentes isoformas de CRUS do camarão *L. vannamei* (em torno de 85%). Este foi o primeiro relato da presença de ALF e CRUS em camarões peneídeos nativos brasileiros. A PEN já havia sido detectada em *F. paulensis* e *L. schmitti*. Atualmente, alguns dos PAM identificados estão em fase de expressão em sistema recombinante, para posteriormente determinar seu espectro de ação frente a diferentes grupos de microrganismos e verificar seu potencial como agente terapêutico em saúde humana, veterinária e aquíicultura.

**Palavras-chave:** peptídeos antimicrobianos, camarões peneídeos, clonagem molecular.

## ABSTRACT

Antimicrobial proteins or peptides (AMP) are major components of the immune system, which are widely distributed among vertebrates, invertebrates and plants. They are small cationic and amphipatic molecules that exhibit a rapid and potent activity against a broad range of microorganisms. In penaeid shrimp, three different classes of AMP have been isolated and molecular and functionally characterized from the blood cells or hemocytes: penaeidins (PEN), crustins (CRUS) and anti-lipopolsaccharide factors (ALF). The main purpose of this study was to detect, clone and molecularly characterize, gene sequences similar to PEN, CRUS and ALF from the hemocytes of the indigenous penaeid shrimp *Farfantepenaeus paulensis*, *F. subtilis* and *Litopenaeus schmitti* and also construct phylograms from the obtained sequences. It was possible to amplify cDNA sequences of the three AMP classes mentioned above, using primers based on consensus regions of corresponding sequences available at the GenBank. In *F. subtilis*, a PEN-like sequence, belonging to the subgroup 2, was cloned and named *Farsub* PEN2-1 (GenBank: EF450742). It coded for a mature peptide composed of 54 amino acids, highly cationic, and exhibited a high amino acid identity with PEN2 isoforms of *F. paulensis* (91-93%). In *L. schmitti*, but not in other penaeids, one amplification product corresponding to an ALF-like sequence was obtained and called *Litsch* ALF (GenBank: DQ991357). It coded for a mature peptide of 98 amino acids exhibiting 93 and 95% of amino acid similarity with the ALF of *F. chinensis* and *L. vannamei* respectively. On the other hand, CRUS-like sequences were obtained in all three penaeid species, and were named *Farsub* CRUS (127 amino acids, GenBank: EF450744), *Farpau* CRUS (150 amino acids, GenBank: EF182747) and *Litsch* CRUS (148 amino acids, GenBank: EF182748). The three CRUS sequences coded for peptides containing a hydrophobic N-terminal sequence rich in glycine residues and a C-terminal sequence with twelve conserved cysteine residues and a WAP domain. All obtained CRUS sequences had amino acid similarity with different isoforms of *L. vannamei* CRUS (about 85%). This is the first report of ALF and CRUS sequences in indigenous Brazilian penaeid shrimp. PEN sequences were already described in *F. paulensis* e *L. schmitti*. Some of the cloned AMP are presently under expression through recombinant system, for further evaluate their antimicrobial activity spectra and their potential use as therapeutic agents for human and veterinary health and also aquaculture.

**Key words:** antimicrobial peptides, penaeid shrimps, molecular cloning.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação esquemática de alguns mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos (PAM). A ação dos diferentes PAM pode se manifestar por uma atividade detergente (A) ou pela formação de poros (B) nas membranas dos microrganismos (adaptado de TOKE, 2005). 06
- Figura 2:** Assinatura da família das peneidinas. Resíduos aminoacídicos variáveis estão representados por “X” (adaptado de GUEGUEN et al., 2006). 09
- Figura 3:** Representação da estrutura terciária das peneidinas *Litvan* PEN3-1 de *Litopenaeus vannamei* (A) e *Litset* PEN4-1 de *Litopenaeus setiferus* (B). (adaptado de YANG et al., 2003 e CUTHBERTSON et al., 2005). 10
- Figura 4:** Representação esquemática da estrutura terciária cíclica do domínio de ligação a LPS do fator anti-lipopolissacarídeo de *Limulus polyphemus* (adaptado de RIED et al., 1996). 12
- Figura 5:** Assinatura da região WAP encontrada na porção carboxi-terminal das crustíneas de peneídeos. A quantidade variada de resíduos aminoacídicos numa seqüência está representado por “X<sub>n</sub>”, onde “X” representa um aminoácido qualquer (adaptado de BARTLETT et al., 2002). 16
- Figura 6:** Esquema estrutural de um fragmento de cDNA codificante para os diferentes subgrupos de peneidinas, sendo que o produto de amplificação esperado foi estimado em aproximadamente 290 pb. 22

- Figura 7:** Esquema estrutural do fragmento de cDNA codificante para isoforma 3 do fator anti-lipopolissacarídeo de *Penaeus monodon* (ALFPm3a, número de acesso no GenBank: BI784450), sendo que o produto de amplificação esperado foi estimado em aproximadamente 400 pb. 22
- Figura 8:** Esquema estrutural do fragmento de cDNA codificante para diferentes isoformas de crustinas de *Litopenaeus vannamei*, sendo que o produto de amplificação esperado foi estimado em aproximadamente 450 pb. 23
- Figura 9:** Representação esquemática da síntese e amplificação das seqüências de cDNA utilizando-se diferentes conjuntos de iniciadores. 24
- Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação de um fragmento de 290 pb correspondendo potencialmente a uma peneidina (PEN) de *Farfantepenaeus subtilis*. Linha 1: marcador de peso molecular (escala de 100 pb); linha 2: controle negativo sem cDNA; linha 3: *F. subtilis*. 29
- Figura 11:** Seqüência nucleotídica e aminoacídica deduzida da peneidina *Farsub* PEN2-1 de *Farfantepenaeus subtilis* (GenBank: EF450742). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada e o códon de terminação indicado por asterisco (\*). 30
- Figura 12:** Alinhamento múltiplo das seqüências aminoacídicas deduzidas de PEN2 entre *Farfantepenaeus subtilis* e diferentes espécies de peneídeos. As diferentes isoformas de PEN2 estão representadas à esquerda: *Farsub* PEN2-1 (GenBank: EF450742), *Farpau* PEN2-1 e PEN2-2 (AY956416, AY956417); *Litvan* PEN2-1, PEN2-3 e PEN2-4 (Y14925, AF390146, DQ211699); *Litset* PEN2-1 (AY039205); *Litsch* PEN2-1 e PEN2-2 (AY956418, AY956419); *Litsty* PEN2-1 (AY351655). Resíduos idênticos a todas às seqüências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (\*). Os hífen indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:) resíduos pouco e muito similares, respectivamente. 32

**Figura 13:** Filograma consenso resultante do alinhamento das seqüências aminoacídicas deduzidas dos quatro subgrupos de PEN encontrados em camarões. Os valores presentes em cada nó representam a porcentagem de vezes que um determinado nó ocorreu em 1.000 árvores geradas pelo programa MEGA. Os diferentes subgrupos de PEN encontram-se destacados por meio de caixas pontilhadas em azul e *Farsub* PEN2-1 em caixa vermelha. A barra significa distância. 33

**Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação de um fragmento de 400 pb correspondendo potencialmente para o fator anti-lipopolissacarídeo (ALF) na espécie *Litopenaeus schmitti*. Linha 1: marcador de peso molecular (escala de 100 pb); linha 2: controle negativo sem cDNA; linha 3: *L. schmitti*; linha 4: *Farfantepenaeus paulensis*; linha 5: *Farfantepenaeus subtilis*. 34

**Figura 15:** Seqüência nucleotídica e aminoacídica deduzida do fator anti-lipopolissacarídeo *Litsch* ALF de *Litopenaeus schmitti* (Genbank: DQ991357). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada e o códon de terminação indicado por asterisco (\*). 35

**Figura 16:** Alinhamento múltiplo das seqüências aminoacídicas deduzidas dos fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF) de *Litopenaeus schmitti* e diferentes espécies de peneídeos. As diferentes isoformas de ALF estão representadas à esquerda: *Litsch* ALF (DQ991357); *Litvan* ALF1 e ALF3 (DQ208701, DQ208703); ALFPm1-5 (BI784449; BI784448; BI784450; BI784451; CF415871); M-ALF (AB210110); *Litsty* ALF (DQ010421). Resíduos idênticos a todas às seqüências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (\*). Os hífen indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:) resíduos pouco e muito similares, respectivamente. 37

**Figura 17:** Filograma consenso resultante do alinhamento das seqüências aminoacídicas deduzidas de fatores anti-lipopolissacarídeos. Os valores presentes em cada nó representam a porcentagem de vezes que um determinado nó ocorreu em 1.000 árvores geradas pelo programa MEGA. Os dois sugeridos grupos de ALF encontram-se destacados por meio de caixas pontilhadas em azul e *Litsch* ALF em caixa vermelha. A barra significa distância. 38

**Figura 18:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação de seqüências codificantes correspondendo potencialmente para crustinas (CRUS) de diferentes peneídeos a partir dos iniciadores CRUS-Fw e *anchor*. Linha 1: marcador de peso molecular (escala de 100 pb); linha 2: controle negativo sem cDNA; linha 3: *Farfantepenaeus subtilis*; linha 4: *Farfantepenaeus paulensis*; linha 5: *Litopenaeus schmitti*. 39

**Figura 19:** Seqüência nucleotídica e aminoacídica deduzida da crustina *Farsub* CRUS de *Farfantepenaeus subtilis* (GenBank: EF450744). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada. O códon de terminação está indicado por asterisco (\*) e a região de poliadenilação destacada por um sublinhado duplo. 40

**Figura 20:** Seqüência nucleotídica e aminoacídica deduzida da crustina *Farpau* CRUS de *Farfantepenaeus paulensis* (GenBank: EF182747). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada. O códon de terminação está indicado por asterisco (\*) e a região de poliadenilação destacada por um sublinhado duplo. 41

**Figura 21:** Seqüência nucleotídica e aminoacídica deduzida da crustina *Litsch* CRUS de *Litopenaeus schmitti* (GenBank: EF182748). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada. O códon de terminação está indicado por asterisco (\*) e a região de poliadenilação destacada por um sublinhado duplo.

42

**Figura 22:** Alinhamento múltiplo das seqüências aminoacídicas deduzidas de crustinas (CRUS) de diferentes espécies de peneídeos, incluindo as três espécies nativas. As diferentes isoformas de CRUS estão representadas à esquerda: crustin *Ls1-3* (AF430077; AF430078; AF430079); crustin *Lv1, Lv3 e Lv5* (AF430071; AF430073; AF430075); crus*Mj1, Mj2 e Mj5* (AB121740; AB121741; AB121744); crus*Pm1* (CD766060); *Farsub* CRUS (GenBank: EF450744); *Farpau* CRUS (EF182747); *Litsch* CRUS (EF182748); Cru*Fc* (DQ097703). Resíduos idênticos a todas às seqüências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (\*). Os hífen indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:) resíduos pouco e muito similares, respectivamente.

46

**Figura 23:** Filograma consenso resultante do alinhamento das seqüências aminoacídicas deduzidas de crustinas (CRUS) de diferentes espécies de crustáceos. Os valores presentes em cada nó representam a porcentagem de vezes que um determinado nó ocorreu em 1.000 árvores geradas pelo programa MEGA. *Farsub* CRUS, *Farpau* CRUS e *Litsch* CRUS encontram-se destacados por meio de caixas. A barra significa distância.

47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Nome e seqüência dos iniciadores utilizados na amplificação das seqüências de cDNA dos peptídeos antimicrobianos investigados nas diferentes espécies de peneídeos. 21
- Tabela 2:** Parâmetros bioquímicos da peneidina *Farsub* PEN2-1 de *Farfantepenaeus subtilis*. 31
- Tabela 3:** Parâmetros bioquímicos do fator anti-lipopolissacarídeo de *Litsch* ALF de *Litopenaeus schmitti*. 36
- Tabela 4:** Parâmetros bioquímicos das crustinas de *Farfantepenaeus subtilis* (*Farsub* CRUS), *Farfantepenaeus paulensis* (*Farpau* CRUS) e *Litopenaeus schmitti* (*Litsch* CRUS). 43

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>°C</b>	Graus centígrados
<b>ALF</b>	Fator Anti-lipopolissacarídeo (do inglês <i>anti-lipopolysaccharide factor</i> )
<b>cDNA</b>	DNA complementar ao RNA mensageiro
<b>CRUS</b>	Crustina
<b>Da</b>	Dalton
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Deoxinucleotídeos trifosfatados
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetraacético
<b>EST</b>	Etiquetas de seqüência expressa/transcrita (do inglês <i>expressed sequence tags</i> )
<b>g</b>	Grama
<b>h</b>	Hora
<b>LB</b>	Meio Luria-Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>M</b>	Molar
<b>MAS</b>	Solução de Alsever modificada (do inglês <i>modified Alsever solution</i> )
<b>min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>Mw</b>	Massa molecular (do inglês <i>molecular weight</i> )
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>OD</b>	Densidade ótica (do inglês <i>optical density</i> )
<b>ORF</b>	Fase/janela aberta de leitura (do inglês <i>open reading frame</i> )
<b>PAM</b>	Peptídeo antimicrobiano
<b>pb</b>	Pares de base de DNA
<b>PBS</b>	Tampão salina fosfato (do inglês <i>phosphate-buffered saline</i> )

<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i> )
<b>PEN</b>	Peneidina
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RNAi</b>	RNA de interferência
<b>RT-PCR</b>	Reação de transcrição reversa (do inglês <i>reverse transcription Polymerase chain reaction</i> )
<b>s</b>	Segundo
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>U</b>	Unidade de atividade enzimática
<b>UTR</b>	Região não traduzida (do inglês <i>untranslated region</i> )
<b>V</b>	Volt
<b>v</b>	Volume
<b>WAP</b>	do inglês <i>Whey Acidic Protein</i>
<b>WSSV</b>	Síndrome da Mancha Branca (do inglês <i>White Spot Syndrome Virus</i> )
<b>x g</b>	Força gravitacional
<b>X-GAL</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo

### *Aminoácidos*

<b>A</b> – Alanina	<b>C</b> – Cisteína	<b>D</b> – Ácido aspártico
<b>E</b> – Ácido glutâmico	<b>F</b> – Fenilalanina	<b>G</b> – Glicina
<b>H</b> – Histidina	<b>I</b> – Isoleucina	<b>K</b> – Lisina
<b>L</b> – Leucina	<b>M</b> – Metionina	<b>N</b> – Asparagina
<b>P</b> – Prolina	<b>Q</b> – Glutamina	<b>R</b> – Arginina
<b>S</b> – Serina	<b>T</b> – Treonina	<b>V</b> – Valina
<b>W</b> – Triptofano	<b>Y</b> – Tirosina	



## SUMÁRIO

Resumo .....	viii
Abstract .....	ix
Lista de ilustrações .....	x
Lista de tabelas .....	xv
Lista de símbolos, abreviaturas e siglas .....	xvi
<b>1. Introdução .....</b>	<b>01</b>
1.1 Peptídeos Antimicrobianos .....	03
1.2 Peneidinas (PEN) .....	08
1.3 Fatores Anti-lipopolissacarídeos (ALF) .....	12
1.4 Crustinas (CRUS) .....	15
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1 Material biológico .....	19
3.2 Obtenção dos hemócitos .....	19
3.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA fita simples .....	20
3.4 Desenho dos iniciadores .....	21
3.5 Amplificação das seqüências de cDNA .....	23
3.6 Clonagem e seqüenciamento dos insertos .....	25
3.6.1 Preparo de bactérias competentes .....	25
3.6.2 Transformação das bactérias competentes .....	25
3.6.3 Extração plasmidial e seqüenciamento dos insertos .....	26
3.7 Análise das seqüências gênicas .....	27
<b>4. Resultados .....</b>	<b>29</b>
4.1 Peneidinas (PEN) .....	29
4.2 Fatores Anti-lipopolissacarídeos (ALF) .....	34
4.3 Crustinas (CRUS) .....	39

<b>5. Discussão</b> .....	49
<b>6. Conclusões</b> .....	61
Referências .....	63
Apêndices .....	72

## 1. INTRODUÇÃO

Microorganismos patogênicos e/ou oportunistas representam uma grande ameaça à integridade corpórea e homeostática das espécies animais e vegetais. Muitos desses microrganismos possuem uma alta capacidade de infecção, podendo bloquear ou escapar do sistema imunológico do hospedeiro, apesar de seus potentes mecanismos microbicidas. Embora avanços consideráveis tenham sido realizados nestas últimas décadas no desenvolvimento de novas drogas, muitos microrganismos têm a capacidade de desenvolver resistência, tornando-se rapidamente insensíveis a estas drogas e recuperando seu potencial infeccioso. Essa situação compromete tanto setores ligados à saúde humana, quanto aos ligados à agricultura, medicina veterinária e aqüicultura. Em decorrência dessas circunstâncias, a busca por novos agentes farmacológicos tem levado à investigação de compostos naturais capazes de minimizar ou até mesmo eliminar agentes altamente infecciosos e de resistência múltipla (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Compostos naturais representam uma fonte inesgotável de estruturas químicas e dependendo de sua atividade biológica podem tornar-se muito promissores no combate a doenças. Dentre esses compostos destacam-se os peptídeos e/ou proteínas antimicrobianas (PAM), cujo mecanismo de ação microbicida é raramente capaz de induzir resistência em microrganismos (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004). Embora muitos desses PAM tenham sido isolados e caracterizados a partir de um considerável número de espécies animais e vegetais, com destaque aos insetos onde a grande maioria dos peptídeos atualmente conhecidos foi isolada, pouquíssimos estudos têm se concentrado na busca destas moléculas na vasta biodiversidade brasileira. Dos raros relatos existentes podemos salientar a gomesina e acanthoscurrina, isoladas e caracterizadas dos hemócitos da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* (SILVA; DAFFRE; BULET, 2000; LORENZINI et al., 2003b).

No que diz respeito aos crustáceos marinhos, o único relato em espécies nativas brasileiras, até o momento, é o de Barracco e colaboradores (2005) que detectaram a presença de peneídeos em dois camarões peneídeos nativos, *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*. Os peneídeos incluem espécies que são mundialmente apreciadas e seu cultivo reveste-se de grande importância sócio-econômica, uma vez que traz muitas divisas aos países produtores, gerando ainda inúmeros empregos. Atualmente, as infecções, principalmente as virais, constituem a mais séria ameaça ao sucesso dos cultivos em todo o mundo. Estas podem levar a prejuízos incalculáveis no setor aquícola, como recentemente ilustrado pela doença da “mancha branca” que acometeu os cultivos de *Litopenaeus vannamei* no Estado de Santa Catarina (BONNICHON; LIGHTNER; BONAMI, 2006).

Para contornar este sério problema, a aquíicultura tem feito uso contínuo de antibióticos com o objetivo de prevenir e controlar infecções. Contudo, esta prática vem se tornando cada vez mais contra-indicada, haja vista a resistência dos microorganismos a estas drogas, a contaminação do ambiente e a produção de camarões impróprios para consumo humano. Neste contexto, a busca de antibióticos alternativos como os PAM, produzidos inclusive naturalmente por espécies cultivadas, poderia contribuir sobremaneira para o sucesso dos cultivos, prevenindo e controlando infecções, evitando problemas de resistência e ainda preservando o ambiente, uma vez que estas moléculas são ecologicamente inócuas.

A busca de novas classes ou isoformas de PAM em espécies nativas brasileiras poderia ainda revelar estruturas químicas diferentes e/ou novas que apresentem um amplo espectro de atividade contra diferentes tipos de microorganismos patogênicos. Esses compostos poderiam, assim, representar uma nova geração de agentes terapêuticos, podendo encontrar aplicações não apenas em aquíicultura, como também em saúde humana e veterinária, no sentido de constituir uma alternativa biotecnológica para o problema do crescente número de linhagens de microorganismos resistentes aos antibióticos atualmente utilizados.

## 1.1 Peptídeos Antimicrobianos

Proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAM) são componentes essenciais do sistema imune inato, podendo apresentar uma atividade microbicida rápida e potente contra um amplo espectro de microrganismos. Devido a essas características e também pelo fato de funcionarem como efetores de defesa de baixa especificidade, os PAM são considerados moléculas-chave na busca de novos agentes terapêuticos (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004).

Os genes que codificam para os PAM estão amplamente distribuídos entre os diferentes reinos de seres vivos, tendo sido encontrados desde bactérias até mamíferos, incluindo protozoários, invertebrados e plantas. Essas moléculas foram inicialmente identificadas por Steiner e colaboradores (1981) na hemolinfa da mariposa *Hyalophora cecropia* e desde então, mais de mil diferentes peptídeos têm sido isolados e caracterizados (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

Os PAM são moléculas relativamente pequenas, contendo menos de 150-200 resíduos de aminoácidos em sua composição. A maioria desses efetores imunológicos possui características altamente catiônicas, devido à presença de uma grande quantidade de aminoácidos carregados positivamente, ou ainda, em alguns casos, pela amidação de sua região carboxi-terminal. Os PAM destacam-se ainda por apresentar geralmente características anfipáticas, o que facilita a sua interação e inserção nos fosfolipídios aniônicos presentes na face externa das membranas de muitos microrganismos (BOMAN, 2003).

De acordo com a sua composição aminoacídica e estrutura tridimensional, os PAM foram classificados em quatro grandes classes: (1) peptídeos  $\alpha$ -hélice linear anfipáticos, (2) peptídeos cíclicos ou cíclicos com extremidades abertas com uma ou mais pontes de cisteína, (3) peptídeos ricos em um tipo particular de aminoácido e (4) peptídeos gerados a partir da

hidrólise de uma proteína precursora (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004). Os peptídeos lineares são comumente ricos em resíduos de lisina e arginina e apresentam uma região amino-terminal anfipática, na conformação de uma  $\alpha$ -hélice, e uma região carboxi-terminal amidada bastante hidrofóbica. Entre os representantes desse grupo estão alguns PAM isolados de insetos (cecropinas; moricinas), tunicados (clavanina A), anfíbios (magainina 1) e mamíferos (catelicidinas) (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

Os peptídeos cíclicos com extremidades abertas ou fechadas caracterizam-se por apresentar diferentes tipos de estrutura, definidas e estabilizadas pela presença de pontes intramoleculares entre resíduos de cisteína. Esses PAM podem adotar a conformação do tipo folha  $\beta$ -pregueada, como encontrado na maioria das defensinas de vertebrados, ou pela formação de um grampo ( *$\beta$ -hairpin*) com folhas  $\beta$ -pregueadas estabilizadas por uma ou duas pontes dissulfeto, como os peptídeos taquiplesina e gomesina, encontrados em quelicerados (KAWANO et al., 1990; SILVA; DAFFRE; BULET, 2000). Essa categoria de PAM pode ainda conter estruturas mais complexas pela formação conjunta de  $\alpha$ -hélice e de folha  $\beta$ -pregueada. Tal estrutura é encontrada em algumas defensinas de invertebrados, plantas e mamíferos (TINCU; TAYLOR, 2004).

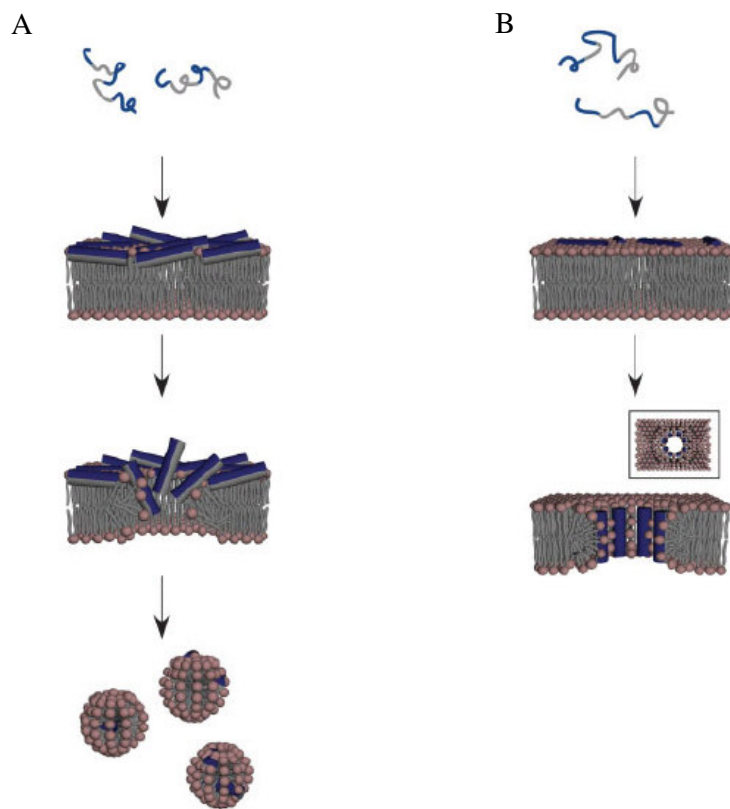
A terceira classe de PAM caracteriza-se por apresentar em sua composição um alto conteúdo de um ou dois resíduos aminoacídicos específicos, como glicina, prolina, histidina ou triptofano. Os peptídeos pertencentes a essa classe têm sido isolados de uma grande variedade de artrópodos, destacando-se a acanthoscurrina, a dipterocina e a coleoptericina (ricos em resíduos de glicina) e as apidecinas e drosocinas (ricos em resíduos de prolina) (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

A última classe de PAM é composta por peptídeos gerados a partir da hidrólise parcial de um precursor protéico. Entre os PAM integrantes desse grupo estão as buforinas, originadas a partir da clivagem de um segmento da histona H2A do anfíbio *Bufo bufo*

*garagrisans* (KIM et al., 1996) e um fragmento da hemoglobina de bovinos isolado do intestino do carrapato *Boophilus microplus* (FOGAÇA et al., 1999). Recentemente, peptídeos derivados da porção carboxi-terminal da hemocianina foram também identificados em duas espécies de crustáceos (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2001; LEE; LEE; SÖDERHÄLL, 2003).

O local de síntese dos PAM é variável entre os diferentes organismos. Em muitas espécies de insetos, esses são sintetizados nos corpos gordurosos e secretados para a hemolinfa, onde atuam de forma sistêmica (TZOU et al., 2000). Em contrapartida, em outras espécies como limulídeos, camarões, moluscos e aranhas muitos PAM são sintetizados e armazenados nos grânulos das células da hemolinfa ou hemócitos (SHIGENAGA et al., 1990; DESTOUMIEUX et al., 2000b; MITTA et al., 2000; LORENZINI et al., 2003a). Dependendo da espécie, esses imuno-efetores podem estar constitutivamente presentes ou serem induzidos no momento de uma infecção, como ocorre em certas espécies de dípteros (HOFFMANN; REICHART; HETRU, 1996).

O mecanismo de ação dessas moléculas manifesta-se geralmente por uma atividade *detergente* sobre as membranas dos microrganismos ou pela *formação de poros*, ou ainda pela interferência na síntese de macromoléculas importantes no seu metabolismo (Figura 1). Os diferentes PAM, caracterizados até o momento, mostraram possuir uma atividade inibitória contra um amplo espectro de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e, em alguns casos também vírus e protozoários (BACHÈRE et al., 2004; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004).



**Figura 1:** Representação esquemática de alguns mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos (PAM). A ação dos diferentes PAM pode se manifestar por uma atividade detergente (A) ou pela formação de poros (B) nas membranas dos microrganismos (adaptado de TOKE, 2005).

Somente em meados da década de 90, peptídeos com atividade microbicida foram isolados de algumas espécies de crustáceos, incluindo camarões. O primeiro PAM isolado e parcialmente caracterizado de um crustáceo refere-se a um peptídeo catiônico de 6,5 kDa do caranguejo *Carcinus maenas*, rico em resíduos de prolina, e cujo espectro de ação envolve tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (SCHNAPP; KEMP; SMITH, 1996). Os mesmos autores identificaram ainda outro PAM de 11,5 kDa com atividade restrita a bactérias Gram-positivas marinhas, que mais tarde foi caracterizado como uma molécula hidrofóbica rica em resíduos de cisteína (RELF et al., 1999).



Embora só recentemente os PAM de invertebrados marinhos tenham recebido atenção, muitos trabalhos vêm atualmente sendo desenvolvidos, relatando a detecção e a caracterização de novos PAM. Entre as novas classes PAM recém caracterizadas em crustáceos estão a calinectina de *Callinectes sapidus* (KHOO; ROBINETTE; NOGA, 1999), a astacidina de *Pacifastacus leniusculus* (LEE; LEE; SÖDERHÄLL, 2003), a armadilidina de *Armadillidium vulgare* (HERBINIÈRE et al., 2005) e a scigonadina de *Scylla serrata* (WANG et al., 2007).

No que diz respeito a camarões, uma família de PAM com atividades antifúngica e antibacteriana foi isolada e caracterizada a partir da hemolinfa do peneídeo *L. vannamei*, sendo batizada como peneidina (DESTOUMIEUX et al., 1997). Posteriormente, peptídeos semelhantes ao de *C. maenas* (11,5 kDa) e aos fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF), inicialmente descritos em limulídeos, foram também identificados em camarões (GROSS et al., 2001).

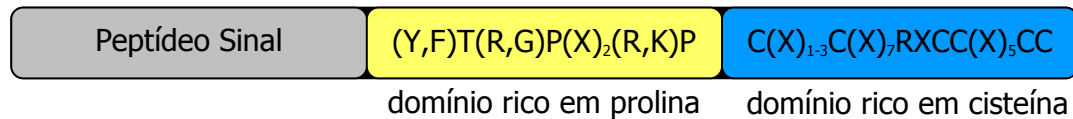
## 1.2 Peneidinas (PEN)

As peneidinas (PEN) são peptídeos antimicrobianos de 5,48 a 6,62 kDa, inicialmente isolados e caracterizados a partir da hemolinfa do camarão *L. vannamei*. São moléculas altamente catiônicas compostas por uma região amino-terminal rica em resíduos de prolina e uma região carboxi-terminal contendo seis resíduos de cisteína ligados por três pontes dissulfídicas. Esse tipo de estrutura mostra-se único entre as famílias de PAM, fazendo com que essas moléculas sejam classificadas como uma nova família de peptídeos antimicrobianos (DESTOUMIEUX et al., 1997).

Posteriormente, outras PEN foram também detectadas em várias outras espécies de camarões peneídeos, por diferentes metodologias. A presença de PEN foi confirmada em *Litopenaeus setiferus* (GROSS et al., 2001), *Marsupenaeus japonicus* (ROJTINNAKORN et al., 2002), *Penaeus monodon* (SUPUNGUL et al., 2002), *Fenneropenaeus chinensis* (KANG et al., 2004), *Litopenaeus stylirostris* (MUÑOZ et al., 2004), *Penaeus semisulcatus* (apud GUEGUEN et al., 2006) e nos camarões brasileiros *L. schmitti* e *F. paulensis* (BARRACCO et al., 2005).

A comparação das seqüências aminoacídicas das diferentes peneidinas dos diversos peneídeos permitiu ainda subdividir esta família de PAM em 3 subgrupos distintos denominados PEN2, PEN3 e PEN4, sendo que cada subgrupo contém, por sua vez, diferentes isoformas (Apêndice A). As PEN1, inicialmente identificadas em *L. vannamei*, foram posteriormente re-classificadas e identificadas como isoformas pertencentes ao subgrupo 2. Ainda mais recentemente, um novo subgrupo de peneidinas (PEN5) foi identificado nos camarões *P. monodon* e *F. chinensis* (CHEN; PAN; KUO, 2004b; KANG et al., 2007). Hoje se sabe que cada subgrupo de PEN é codificado por um gene distinto e que a diversidade de isoformas encontrada em cada subgrupo é gerada através de polimorfismo de cada um desses

genes (O'LEARY; GROSS, 2006; KANG et al., 2007). Através de comparação de seqüências de aminoácidos e de alinhamento por similaridade foi proposta uma assinatura para peneidinas (GUEGUEN et al., 2006), conforme ilustrado na figura 2.



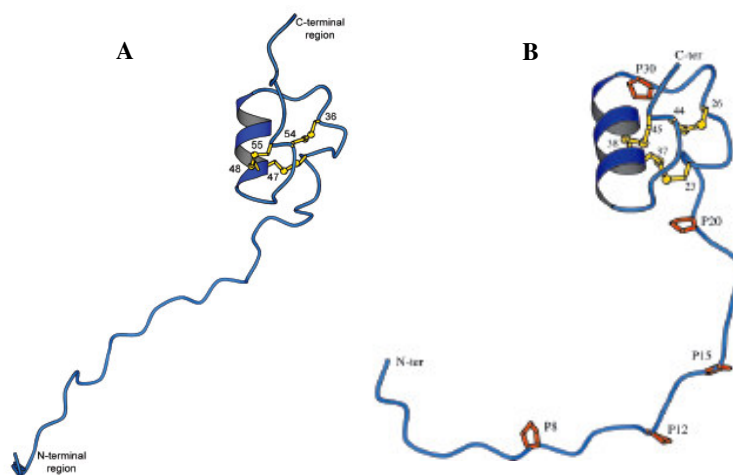
**Figura 2:** Assinatura da família das peneidinas. Resíduos aminoacídicos variáveis estão representados por “X” (adaptado de GUEGUEN et al., 2006).

Destoumieux e colaboradores (1997) mostraram que as PEN são sintetizadas como moléculas precursoras, com um peptídeo sinal de cerca de 20 aminoácidos, sendo imediatamente processadas em uma molécula bioativa. Após clivagem do peptídeo sinal, ocorre a amidação do domínio carboxi-terminal (DESTOUMIEUX et al., 2000a). Todas as PEN descritas até o momento apresentaram um peptídeo sinal de seqüência altamente conservada que antecede o peptídeo maduro (O'LEARY; GROSS, 2006).

A expressão de RNA mensageiro codificante para peneidina foi estudada em diferentes tecidos em algumas espécies de peneídeos e apesar de relatos iniciais sobre uma expressão generalizada em diversos tecidos, confirmou-se que a transcrição dessa molécula estava restrita apenas aos hemócitos circulantes na hemolinfa ou aos infiltrados em diferentes órgãos. (DESTOUMIEUX et al., 2000b; MUÑOZ et al., 2002; KANG et al., 2004). Segundo Bachère e colaboradores (2004), as peneidinas são constitutivamente sintetizadas e armazenadas nos grânulos dos hemócitos granulares, até o momento de sua liberação (seja no meio intracelular ou extracelular) após o animal ter entrado em contato com um microrganismo. Evidências do acúmulo dessas moléculas nos grânulos dos hemócitos também foram confirmadas através de

imunomarcção e hibridização *in situ* em diferentes espécies de peneídeos (MUÑOZ et al., 2002; KANG et al., 2004; BARRACCO et al., 2005).

Recentemente, as estruturas terciárias da PEN3 de *L. vannamei* (YANG et al., 2003) e da PEN4 de *L. setiferus* (CUTHBERTSON et al., 2005) foram resolvidas, a partir de moléculas produzidas por expressão heteróloga e também por síntese química. Embora cada um desses dois subgrupos de PEN apresente diferenças em relação a sua constituição e número de aminoácidos, ambas as moléculas possuem uma estrutura tridimensional conservada. A região amino-terminal (rica em prolina), apresenta-se pouco definida tridimensionalmente, em contraste à região carboxi-terminal (rica em cisteína) que apresenta uma conformação tridimensional bem estruturada, que consiste numa  $\alpha$ -hélice anfipática (CUTHBERTSON et al., 2005) (Figura 3). Foi identificado ainda um domínio de ligação à quitina na região carboxi-terminal de PEN3, cuja estrutura pode estar associada a sua atividade antifúngica (DESTOUMIEUX et al., 2000b).



**Figura 3:** Representação da estrutura terciária das peneidinas *Litvan* PEN3-1 de *Litopenaeus vannamei* (A) e *Litset* PEN4-1 de *Litopenaeus setiferus* (B). (adaptado de YANG et al., 2003 e CUTHBERTSON et al., 2005).

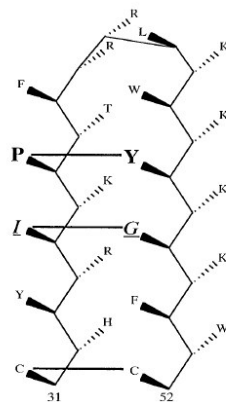
Como outros grupos de PAM, as PEN são ativas contra um amplo espectro de microrganismos, incluindo várias espécies de bactérias Gram-positivas e de fungos filamentosos. A fim de se avaliar a atividade antimicrobiana dos diferentes subgrupos de PEN algumas isoformas foram produzidas por síntese química e/ou por expressão heteróloga. As peneidinas do subgrupo 3 e 5 mostraram atividade marcante contra um grande número de bactérias, especialmente as Gram-positivas (DESTOUMIEUX et al., 1999; LI et al., 2005; KANG et al., 2007). Já as PEN2, especialmente as de *L. vannamei*, possuem atividade mais expressiva contra fungos filamentosos (DESTOUMIEUX et al., 1999).

Por outro lado, as PEN4 mostram-se mais efetivas contra um amplo grupo de fungos filamentosos quando comparadas às demais isoformas. Uma PEN4 quimérica, baseada em *Litset* PEN4-1, foi capaz suprimir a formação de esporos e de interferir no crescimento vegetativo de algumas cepas de fungos de resistência múltipla a antibióticos (CUTHBERTSON; BULLESBACH; GROSS, 2006). Análises comparativas sugerem que o mecanismo de ação envolvido na sua atividade antimicrobiana não esteja restrito apenas a uma simples interação com a membrana, mas também à sua interferência em alguma via alvo dos microrganismos afetados (CUTHBERTSON et al., 2005). Interessantemente, todos os subgrupos de PEN quase não apresentaram atividade contra bactérias Gram-negativas, principalmente contra Vibrionaceae, que contém espécies de bactérias altamente patogênicas para camarões (BACHÈRE et al., 2004).

### 1.3 Fatores Anti-lipopolissacarídeos (ALF)

Os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF) são moléculas constituídas por aproximadamente 100 aminoácidos e foram inicialmente isoladas e caracterizadas nos hemócitos granulares dos limulídeos *Tachypleus tridentatus* e *Limulus polyphemus* (TANAKA et al., 1982; MORITA et al., 1985; AKETAGAWA et al., 1986). Análises da estrutura cristalizada do ALF encontrado em *L. polyphemus* (L-ALF) indicaram a presença de um domínio de ligação a LPS, cuja atividade é de suma importância para a regulação dos processos de coagulação intracelular presentes nesse invertebrado (IWANAGA, 1993).

Os ALF de limulídeos possuem dois resíduos conservados de cisteína que participam na formação uma estrutura terciária cíclica na conformação de um grampo ( $\beta$ -hairpin), que concentra uma região altamente anfipática, onde está presente o domínio de ligação a LPS (HOESS et al., 1993) (Figura 4). Além de neutralizar os efeitos prejudiciais induzidos pelo LPS, o L-ALF apresenta uma potente atividade microbicida contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e negativas (WANG et al., 2002).



**Figura 4:** Representação esquemática da estrutura terciária cíclica do domínio de ligação a LPS do fator anti-lipopolissacarídeo de *Limulus polyphemus* (adaptado de RIED et al., 1996).

Apenas recentemente, moléculas homólogas aos fatores anti-lipopossacarídeos de limulídeos foram detectadas nos hemócitos de camarões marinhos. As primeiras seqüências de ALF foram identificadas nos camarões *L. setiferus* (GROSS et al., 2001) e *P. monodon* (SUPUNGUL et al., 2002) através da técnica de EST (etiquetas de seqüência expressa/transcrita, do inglês *expressed sequence tags*). Foram depositadas no GenBank a partir de 2005, um considerável número de seqüências de ALF de diferentes espécies de crustáceos, incluindo caranguejos, lagostas e camarões (Apêndice B). Contudo, apesar das seqüências gênicas estarem depositadas em diferentes bancos de dados virtuais, poucas publicações existem a respeito de ALF em crustáceos. Entre as espécies de camarões, cuja seqüência gênica codificante para ALF é conhecida estão: *P. monodon*, *M. japonicus*, *F. chinensis*, *L. stylirostris* e *L. vannamei*. Todas as seqüências de ALF conhecidas apresentam os dois resíduos conservados de cisteína, como ocorre em limulídeos.

Supungul e colaboradores (2004) identificaram pelo menos cinco diferentes seqüências de ALF nos hemócitos de *P. monodon*. Entre as isoformas identificadas (ALFPm1–ALFPm5), ALFPm3 destaca-se por sua alta expressividade. Ensaio realizados com camarões desafiados com bactérias Gram-negativas demonstraram que a expressão de ALF nos hemócitos pode ser induzida após uma infecção. Além do aumento da expressão dessas moléculas, identificou-se também um aumento na diversidade de isoformas, cuja expressão não é detectada em animais não desafiados (SOMBOONWIWAT et al., 2006). Sugere-se que a diversidade de isoformas de ALF encontradas em animais desafiados possa estar sendo gerada a partir de *splicing* alternativo de diferentes *exons* nas regiões carboxi e amino-terminal desse PAM (SUPUNGUL et al., 2004).

A isoforma ALFPm3 de *P. monodon* foi produzida em *Pichia pastoris* a fim de se avaliar suas propriedades antimicrobianas. ALFPm3 apresentou uma ação microbicida potente contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e negativas, além de fungos

filamentosos (SOMBOONWIWAT et al., 2005). Experimentos realizados com RNA de interferência (RNAi), baseado na seqüência de ALF do lagostin *P. leniusculus*, demonstraram que o ALF também pode conferir uma proteção antiviral pela inibição da replicação do vírus de crustáceos WSSV (Síndrome da Mancha Branca, do inglês *White Spot Syndrome Virus*) que vem ocasionando perdas incalculáveis no cultivo desses animais (LIU et al., 2006).

Análises estruturais e comparativas da região em forma de grampo, gerada pela ponte dissulfídica dos dois resíduos conservados de cisteína, foram realizadas para o ALF de *M. japonicus* (M-ALF) e o L-ALF. A região cíclica do grampo do M-ALF apresenta, assim como o L-ALF, estruturas anfipáticas com alternância de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos. A fim de se avaliar as propriedades biológicas dessa região da molécula em camarões, diferentes ensaios foram realizados com peptídeos sintéticos. Esses fragmentos moleculares cíclicos baseados na região em forma de grampo demonstraram uma clara atividade inibitória de LPS (NAGOSHI et al., 2006), entretanto não exibiram uma atividade antimicrobiana tão potente quanto o peptídeo na sua forma nativa (SOMBOONWIWAT et al., 2005). Tais evidências sugerem que a região cíclica do ALF de camarões esteja envolvida no reconhecimento de moléculas LPS (presentes nas membranas externas de bactérias Gram-negativas), enquanto que a estrutura completa da molécula possa estar associada à sua atividade microbicida.

A expressão desse PAM nos diferentes órgãos de algumas espécies de peneídeos foi estudada através de ensaios de expressão por RT-PCR e *Northern blot*. Sinais de hibridização foram detectados nos ovários, hepatopâncreas e músculo no camarão *F. chinensis* (LIU et al., 2005) e nos órgãos linfóides, coração, intestino e brânquias no camarão *M. japonicus* (NAGOSHI et al., 2006). Em ambas espécies, foram observados sinais fortes de expressão nas células hemocitárias. Ao que tudo indica, através confirmações por hibridização *in situ*, a expressão de ALF está restrita os hemócitos, presentes na circulação ou infiltrados nos diferentes tecidos, assim como demonstrado para as peneidinas (LIU et al., 2005).



## 1.4 Crustinas (CRUS)

Peptídeos de 11,5 kDa foram inicialmente isolados e caracterizados a partir dos hemócitos granulares do caranguejo *C. maenas*, com características catiônicas e anfipáticas, apresentando atividade restrita contra bactérias marinhas Gram-positivas. A característica mais marcante dessas moléculas refere-se à presença de uma região carboxi-terminal rica em resíduos de cisteína, onde se encontra um domínio WAP (do inglês *whey acidic protein*), indicando uma possível função de inibição de proteases (RELF et al., 1999).

Seqüências gênicas semelhantes a esse PAM têm sido amplamente detectadas em diferentes espécies de crustáceos (Apêndice C). Em camarões peneídeos, seqüências semelhantes aos peptídeos de 11,5 kDa foram inicialmente descritas em *L. vannamei* e *L. setiferus* através da técnica de EST (GROSS et al., 2001). Bartlett e colaboradores (2002), após identificarem diferentes isoformas dessas moléculas nessas duas espécies de peneídeos, propuseram a denominação de *crustina* (CRUS) para essa classe de PAM em camarões.

Após esses primeiros relatos, diferentes isoformas de CRUS já foram identificadas nos camarões *L. vannamei* (BARTLETT et al., 2002; VARGAS-ALBORES et al., 2004), *L. setiferus* (BARTLETT et al., 2002), *P. monodon* (SUPUNGUL et al., 2002), *M. japonicus* (RATTANACHAI et al., 2004) e mais recentemente no camarão chinês *F. chinensis* (ZHANG et al., 2007). As diferentes isoformas encontradas entre os peneídeos possuem uma alta similaridade aminoacídica entre si, com algumas peculiaridades não encontradas nas CRUS de outros crustáceos. Uma característica singular apresentada pelas CRUS de camarões é a presença de uma região amino-terminal rica em resíduos de glicina. A quantidade de repetições desses resíduos entre as diferentes isoformas das diferentes espécies mostra-se bastante variada. Entretanto, a região carboxi-terminal apresenta-se conservada, sendo em geral composta por doze resíduos de cisteína que participam na formação de seis pontes

dissulfídicas. Entre a sequência de cisteínas encontra-se um domínio WAP conservado, cuja assinatura está apresentada na figura 5.



**Figura 5:** Assinatura da região WAP encontrada na porção carboxi-terminal das crustinas de peneídeos. A quantidade variada de resíduos aminoacídicos numa sequência está representado por “Xn”, onde “X” representa um aminoácido qualquer (adaptado de BARTLETT et al., 2002).

A presença de um domínio WAP na região carboxi-terminal de CRUS sugere que essas moléculas possam desempenhar uma atividade similar à realizada por inibidores de proteases (HAGIWARA et al., 2003). Contudo este tipo de atividade não foi ainda confirmada para as CRUS de peneídeos.

Brockton e colaboradores (2007) identificaram pelo menos cinco diferentes isoformas desse peptídeo em *C. maenas*, sendo denominados de *carcininas*. Esses autores sugeriram que as diferentes isoformas de *carcininas* encontradas sejam oriundas da transcrição de um único gene multi-*exon*. Segundo os mesmos autores, as diferentes isoformas parecem ser geradas pela transcrição de diferentes alelos e/ou por mutações pontuais e não como resultado de *splicing* alternativo.

A expressão de CRUS foi estudada em algumas espécies de camarões, através da análise de diferentes órgãos como coração, brânquias, intestino, hepatopâncreas e hemócitos. Baseado unicamente em análises de expressão por RT-PCR, foi possível detectar uma alta expressão dessas moléculas nos hemócitos circulantes, como já demonstrado para as outras duas classes de PAM (RATTANACHAI et al., 2004; ZHANG et al., 2007).

A atividade antimicrobiana das CRUS é muito pouco conhecida. Apenas as CRUS de *F.*

*chinensis* foram produzidas por expressão heteróloga para avaliação de sua atividade microbica frente a diferentes microrganismos. Interessantemente, essas moléculas apresentaram atividade contra um espectro maior de microrganismos do que os peptídeos de 11,5 kDa isolados do caranguejo *C. maenas*. Entretanto, os resultados de inibição de crescimento antimicrobiano, de fungos filamentosos e bactérias, foram mais reduzidos do que usualmente observado para outros PAM (ZHANG et al., 2007).

Em nosso conhecimento, a ocorrência de peptídeos antimicrobianos em camarões brasileiros é ainda praticamente desconhecida, com exceção das peneidinas, descritas muito recentemente em *F. paulensis* e *L. schmitti* (BARRACCO et al., 2005). A busca de PAM em outras espécies de camarão pode ser particularmente importante para um maior entendimento do sistema imune desses animais e de sua capacidade resistir a infecções, contribuindo para um maior controle das enfermidades. Além do mais, em virtude da atividade biológica geralmente muito rápida e de amplo espectro, os PAM de espécies nativas podem representar uma nova geração de agentes terapêuticos, originados da biodiversidade brasileira, podendo encontrar aplicações potenciais não apenas em aquicultura, como também em saúde humana e veterinária, no sentido de constituir uma alternativa para o problema do crescente número de microrganismos resistentes à maioria dos antibióticos atualmente utilizados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar a presença e realizar a caracterização das seqüências codificadoras para os peptídeos antimicrobianos peneidina, crustina e fator anti-lipopolissacarídeo na hemolinfa dos camarões nativos *Farfantepenaeus paulensis*, *F. subtilis* e *Litopenaeus schmitti*.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Desenhar diferentes iniciadores referentes às seqüências gênicas acima mencionadas, a partir de seqüências gênicas de diferentes espécies de peneídeos depositadas em bancos de dados públicos.
2. Verificar a presença de RNA mensageiro (mRNA) codificante para essas moléculas em hemócitos dos diferentes peneídeos por RT-PCR.
3. Realizar a amplificação, clonagem e o seqüenciamento das seqüências codificantes para as três diferentes classes de peptídeos em estudo.
4. Comparar e analisar as seqüências nucleotídicas obtidas e as seqüências aminoacídicas deduzidas com seqüências disponíveis em bancos de dados públicos e caracterizar as seqüências aminoacídicas deduzidas obtidas.
5. Realizar análises filogenéticas entre seqüências de diferentes espécies de invertebrados marinhos utilizando as seqüências obtidas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Material biológico**

Neste trabalho foram utilizadas três espécies nativas de camarões peneídeos, o camarão branco legítimo *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) e as espécies de camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) e *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967). A espécie *F. subtilis* foi obtida diretamente com pescadores da cidade de Fortaleza/CE (3°43'02'' S; 38°32'35'' W), sendo seus hemócitos processados (conforme descrito no item 3.2) e enviados para nosso laboratório pela equipe da Dra. Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira do LABOMAR (Instituto de Ciências do Mar) da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE.

Os camarões das espécies *L. schmitti* e *F. paulensis* foram coletados na baía costeira norte da Ilha de Santa Catarina (27°28'30'' S; 48°33'40'' W) e imediatamente transportados para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura (BEG/CCB/UFSC), onde foram acondicionados em aquários contendo água do mar filtrada e aeração constante por um período mínimo de 24 h e máximo de 72 h. Foram utilizados animais adultos de ambos os sexos, aparentemente saudáveis e no período de intermuda.

#### **3.2 Obtenção dos hemócitos**

A hemolinfa dos peneídeos foi extraída sob a forma de 3 conjuntos de amostras (5 animais de cada espécie) através de punção direta da região ventral, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, utilizando-se uma seringa estéril de 1 ml, na presença de uma solução anticoagulante ou MAS (solução de Alsever modificada: 27 mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,0). Os hemócitos de

cada conjunto de amostras de camarões foram isolados por centrifugação (800 x g por 10 min a 8 °C), lavados em tampão PBS (Difco<sup>®</sup>) e conservados no reagente *RNA later*<sup>®</sup> (Ambion<sup>®</sup>).

### 3.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA fita simples

Amostras de hemócitos dos diferentes peneídeos, conservados em *RNA later*<sup>®</sup>, foram centrifugadas (800 x g por 10 min a 8 °C) e o precipitado resultante homogeneizado na presença de 1 ml do reagente Trizol (Gibco<sup>®</sup>). Posteriormente, a fração correspondente ao RNA foi separada através do acréscimo de 0,2 ml de clorofórmio e precipitada pela adição de 0,5 ml de álcool isopropílico. Após lavagem com álcool 75%, as amostras foram secadas em bomba de vácuo e dissolvidas em 25 µl de água estéril tratada com DEPC. A pureza das amostras de RNA foi avaliada em espectrofotômetro (BioPhotometer – Eppendorf<sup>®</sup>) ( $A_{260/280\text{ nm}} > 1,8$ ).

Para obtenção da primeira fita de cDNA, 1 µg do RNA total de cada espécie foi reversamente transcrito utilizando-se a enzima *SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase* (Invitrogen<sup>®</sup>) na presença de 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen<sup>®</sup>), tampão (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) e um iniciador *oligo (dT)<sub>16</sub>-anchor* (Tabela 1), direcionado para região da cauda poli(A) dos mRNA. Na extremidade 5' desse iniciador oligo (dT)<sub>16</sub> encontra-se um segmento adaptador (*anchor*) de seqüência conhecida, estando presente em todas as fitas de cDNA recém sintetizadas. Em alguns casos, como estratégia de amplificação (conforme descrito no item 3.5), essa região adaptadora serviu de molde para um iniciador específico antisense (*anchor*) (Tabela 1).

### 3.4 Desenho dos iniciadores

A fim de se investigar a presença dos peptídeos antimicrobianos PEN, CRUS e ALF por RT-PCR, diferentes pares de iniciadores foram desenhados a partir das seqüências codificantes para cada uma dessas moléculas disponíveis no GenBank (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), entre diferentes espécies de peneídeos. O nome e a seqüência de cada um dos iniciadores utilizados estão apresentados na tabela 1.

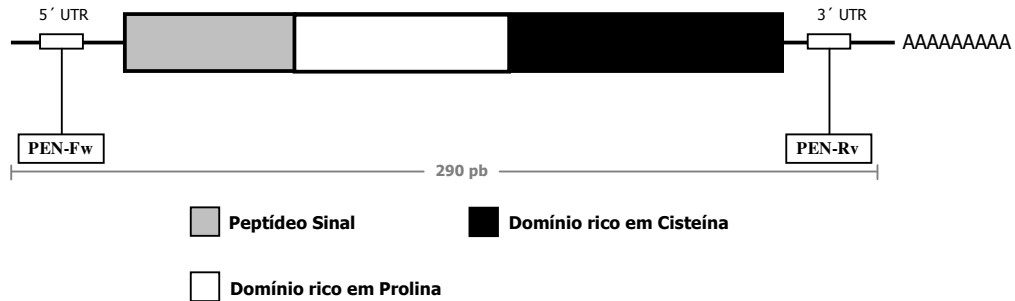
**Tabela 1:** Nome e seqüência dos iniciadores utilizados na amplificação das seqüências de cDNA dos peptídeos antimicrobianos investigados nas diferentes espécies de peneídeos.

Nome do iniciador	Seqüência 5'– 3'
ALF-Fw	CTTTCYTAGTTTAGAAGATGCG
ALF-Rv	GCAAAAGGCCTATGAGCT
CRUS-Fw	TGTACTGGAGGCAACCATGA
CRUS-Rv	TTCTTCTCAACGGAATTGG
PEN-Fw	CGCTCCGAGCCCGGGTTCCTC
PEN-Rv	CCGGTTGACGGAGAAGA
<i>oligo (dT)<sub>16</sub>-anchor</i>	GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T) <sub>16</sub> V
<i>anchor</i>	GACCACGCGTATCGATGTCGAC

Y: C/T; V: A/C/G.

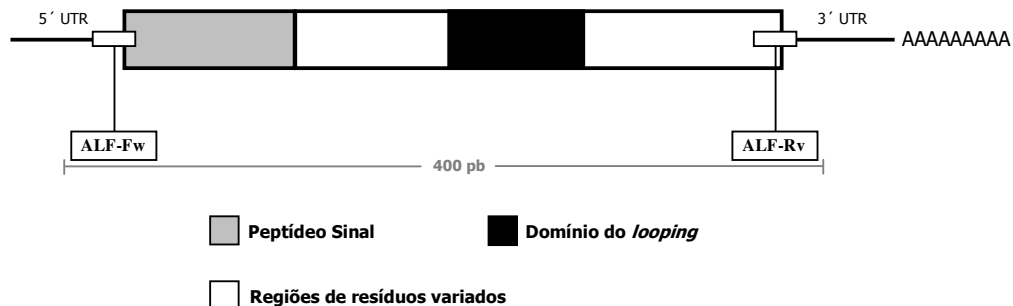
Para a detecção de PEN, um par de iniciadores específicos foi desenhado. O iniciador senso PEN-Fw foi elaborado a partir de uma região 5' UTR localizada antes do peptídeo sinal, que se mostra consenso entre os diferentes grupos de peneídeos de todas as espécies de peneídeos de seqüência gênica conhecida. O iniciador antisenso PEN-Rv foi desenhado a partir de uma região 3' UTR conservada, localizada após a seqüência codificante para PEN (Figura 6). As diferentes seqüências de peneídeos utilizadas para a confecção desses iniciadores estão disponíveis no PENBASE (*The Penaeidin database*: <http://penbase.immunaqua.com>) (GUEGUEN et al., 2006). O produto de amplificação de

tamanho esperado, com esse par de iniciadores, foi estimado em aproximadamente 290 pares de base (pb).



**Figura 6:** Esquema estrutural de um fragmento de cDNA codificante para os diferentes subgrupos de peneidinas, sendo que o produto de amplificação esperado foi estimado em aproximadamente 290 pb.

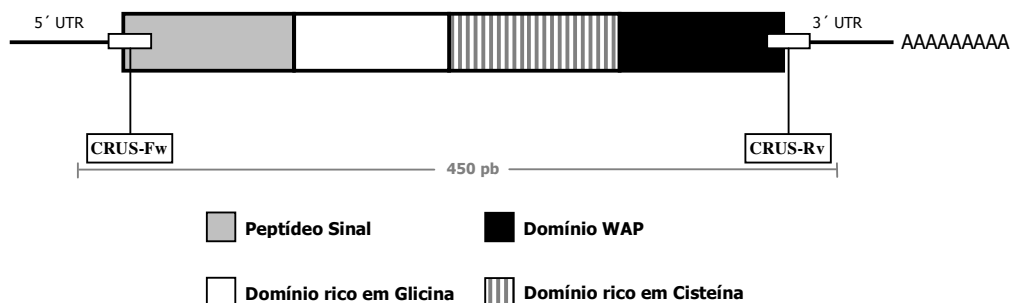
Para a detecção de fatores anti-lipopolissacarídeos, um par de iniciadores foi desenhado a partir da sequência gênica da isoforma 3 do ALF de *P. monodon* (ALFPm3a, número de acesso no GenBank: BI784450). Esse par de iniciadores compreende desde a região inicial do peptídeo sinal (códon de iniciação) até o final do peptídeo maduro (códon de terminação). O produto de amplificação de tamanho esperado foi estimado em 400 pb (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema estrutural do fragmento de cDNA codificante para isoforma 3 do fator anti-lipopolissacarídeo de *Penaeus monodon* (ALFPm3a, número de acesso no GenBank: BI784450), sendo que o produto de amplificação esperado foi estimado em aproximadamente 400 pb.



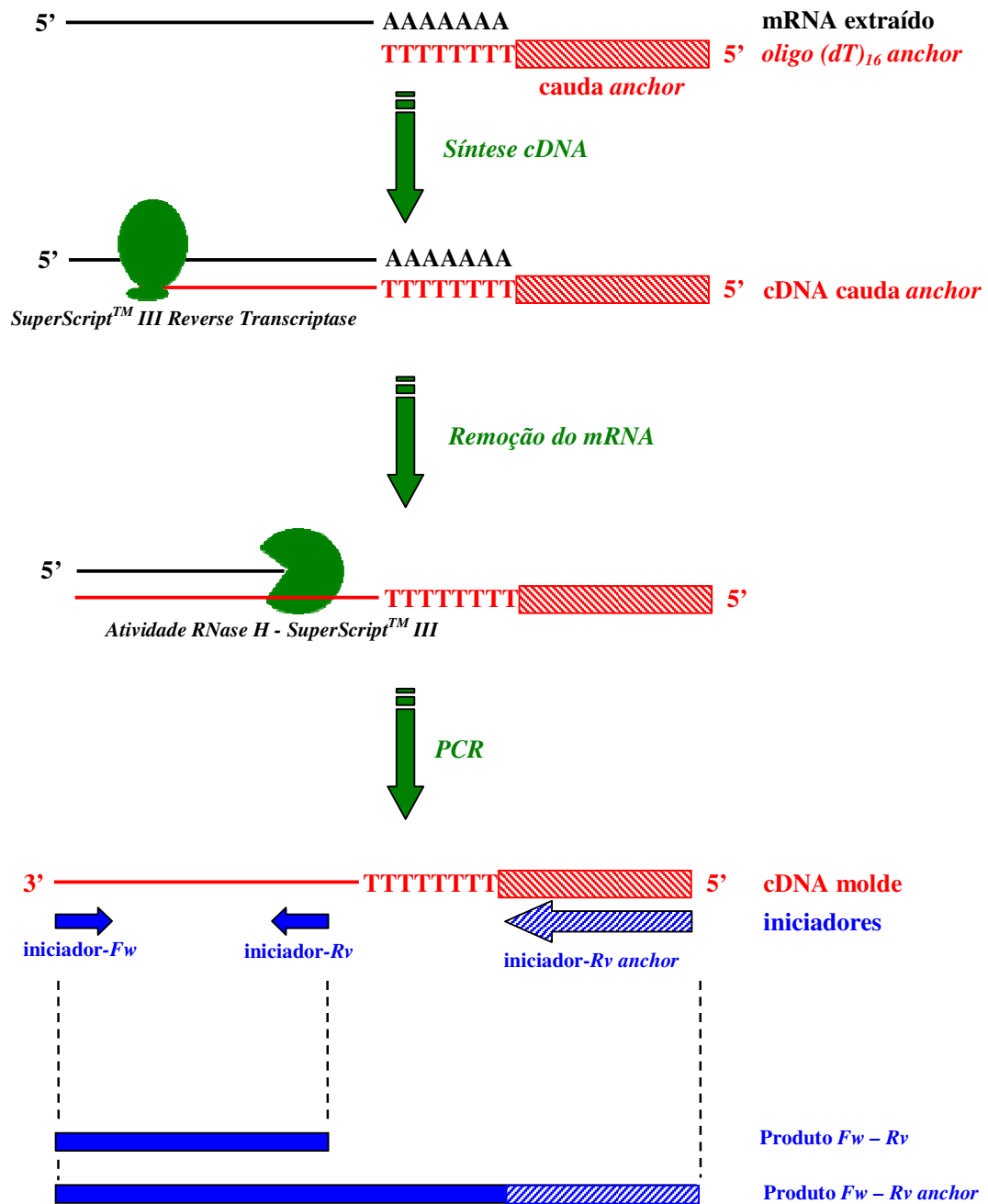
Para a detecção de crustinas nos hemócitos das espécies em estudo, um par de iniciadores foi desenhado, tomando-se como base as seqüências gênicas codificantes para as diferentes isoformas de CRUS encontradas em *L. vannamei* (GenBank: AF430072; AF430073; AF430074; AF430075; AF430076). O produto de amplificação de tamanho esperado foi estimado em aproximadamente 450 pb (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema estrutural do fragmento de cDNA codificante para diferentes isoformas de crustinas de *Litopenaeus vannamei*, sendo que o produto de amplificação esperado foi estimado em aproximadamente 450 pb.

### 3.5 Amplificação das seqüências de cDNA

A amplificação das seqüências gênicas correspondentes aos peptídeos antimicrobianos PEN, ALF e CRUS foi realizada por PCR na presença de 0,5 – 1 µl de cDNA, 0,4 µM de cada iniciador, 1 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen®), 0,2 mM de cada dNTP e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, num volume final de 25 µl. As condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, temperatura de ligação dos iniciadores de 50 – 60 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram examinados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio em água destilada (0,01% v/v). A figura 9 apresenta, resumidamente, as etapas utilizadas na síntese e amplificação das seqüências de cDNA dos diferentes PAM.



**Figura 9:** Representação esquemática da síntese e amplificação das seqüências de cDNA utilizando-se diferentes conjuntos de iniciadores.

Para confirmar a presença de cDNA nas amostras, controles de amplificação foram previamente realizados, amplificando-se uma seqüência de 850 pb, correspondente à proteína intracelular actina, utilizando-se os iniciadores AV1-Fw (5' TAA TCC ACA TCT GCT GGA AGG TGG 3') e AV2-Rv (5' TCA CCA ACT GGG ATG ACA TGG 3') (CADORET et al., 1999). As condições da PCR utilizadas nesta etapa foram: 30 ciclos de 94 °C de desnaturação por 1 min, temperatura de ligação dos iniciadores de 50 °C por 1 min e 72 °C de extensão por 1 min, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 min.

### **3.6 Clonagem e seqüenciamento dos insertos**

#### **3.6.1 Preparo de bactérias competentes**

Suspensões bacterianas de *Escherichia coli* One Shot TOP10 (Invitrogen®) ( $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$ ) foram centrifugadas (5.000 x g por 5 min a 4 °C), homogeneizadas em uma solução estéril de CaCl<sub>2</sub> (100 mM) e incubadas por 1 h no gelo. Após centrifugação (5.000 x g por 5 min a 4 °C), as bactérias foram novamente homogeneizadas na solução de CaCl<sub>2</sub> na presença de 20% de glicerol estéril e mantidas no gelo durante 30 min. As alíquotas recém preparadas foram imediatamente congeladas a -80 °C e assim conservadas até o seu uso.

#### **3.6.2 Transformação das bactérias competentes**

Os produtos de PCR de tamanho esperado foram ligados no vetor plasmidial pCR®2.1 (Invitrogen®) utilizando-se a enzima *T4 DNA Ligase*. As bactérias competentes, previamente preparadas, foram transformadas com esses plasmídios através de choque térmico e repicadas para um meio ágar LB na presença de X-GAL (20 µg/ml) e antibiótico (canamicina/ampicilina – 100 µg/ml).

### 3.6.3 Extração plasmidial e seqüenciamento dos insertos

Colônias de coloração branca, potencialmente contendo as seqüências de interesse, foram repicadas para um novo meio ágar LB na presença de X-GAL e antibiótico e mantidas a 37 °C por 24 h. A comprovação da presença dos insertos nos plasmídios recombinantes foi realizada através da amplificação do inserto por PCR diretamente da colônia de bactérias, utilizando os iniciadores M13-Fw (5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3') e M13-Rv (5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'), os quais são direcionados para as regiões adjacentes do sítio de clonagem do vetor plasmidial pCR<sup>®</sup>2.1 (Invitrogen<sup>®</sup>). A PCR ocorreu na presença de uma alíquota da colônia bacteriana de interesse, 0,4 µM de cada iniciador, 1 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,2 mM de cada dNTP e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, num volume final de 25 µl. As condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, seguido por 28 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, temperatura de ligação dos iniciadores a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72 °C por 10 min e os produtos de PCR examinados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para verificação da presença e do tamanho dos insertos.

Após a comprovação da presença dos insertos de tamanho esperado, as colônias transformadas foram cultivadas em placas contendo 1 ml de meio LB acrescido de antibiótico (100 µg/ml), sendo mantidas sob agitação a 37 °C por um período de 24 h. Após crescimento bacteriano, os plasmídios recombinantes foram extraídos através de um protocolo padrão de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Para estimar a concentração dos plasmídios extraídos, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e comparadas com padrões de DNA de concentração conhecida (*High DNA mass ladder* – Invitrogen<sup>®</sup>).

O seqüenciamento dos insertos de interesse foi realizado utilizando-se o kit *DYEnamic*<sup>®</sup> *ET Dye Terminator* (GE Healthcare<sup>®</sup>), conforme as instruções do fabricante. A reação de seqüenciamento foi realizada na presença de 5 pmol dos iniciadores M13-Fw ou M13-Rv e DNA plasmidial numa concentração aproximada de 1.000 ng. As condições utilizadas foram: 95 °C por 25 s, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, temperatura de ligação dos iniciadores a 55 °C por 20 s e extensão a 60 °C por 90 s. Os produtos obtidos foram precipitados com isopropanol 70% para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. A leitura das bases foi realizada no seqüenciador *MegaBace 1000*<sup>®</sup> *DNA Analysis System* (GE Healthcare<sup>®</sup>), onde as amostras foram eletroinjetadas a 2 kV por 50 s e eletroeluídas por 150 min a 6 kV.

### **3.7 Análise das seqüências gênicas**

As seqüências gênicas obtidas foram submetidas a uma avaliação de qualidade pelo programa *Phred* (índice de confiabilidade  $\geq 20$ ) (EWING et al., 1998) e agrupadas em consenso (*clusters*) através do programa CAP3 (*Sequence Assembly Program*) (HUANG; MADAN, 1999). Após essa análise, as seqüências nucleotídicas e aminoacídicas deduzidas foram confrontadas e analisadas utilizando-se algoritmos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), a fim de se encontrar similaridades com seqüências nucleotídicas (BLASTN) e protéicas (BLASTX) de peptídeos antimicrobianos em outros organismos (ALTSCHUL et al., 1997).

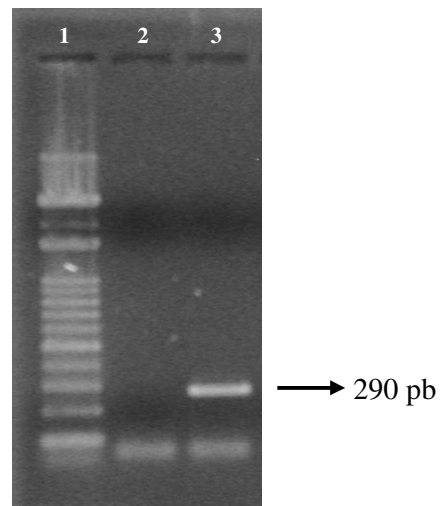
A obtenção (tradução) e análise das seqüências aminoacídicas deduzidas foram estimadas utilizando-se os programas virtuais ProtParam, Compute pI/Mw e Translate do *ExPASy Proteomics (Expert Protein Analysis System*: <http://us.expasy.org/tools>), do Instituto Suíço de Bioinformática (GASTEIGER et al., 2003). O programa virtual SignalP (disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) foi utilizado para estimar os sítios de clivagem

entre os peptídeos sinal e maduro dos diferentes PAM (BENDTSEN et al., 2004). Os alinhamentos múltiplos das seqüências nucleotídicas e aminoacídicas traduzidas foram realizados utilizando-se o software ClustalX (THOMPSON et al., 1997). Após alinhamento, as seqüências comparadas foram submetidas a métodos de *Neighbour-joining* para construção de árvores filogenéticas. Essas árvores foram obtidas utilizando-se o *software* MEGA 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004) com deleção completa de *gaps* e 1.000 replicatas, a fim de checar a repetição dos resultados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Peneidinas (PEN)

A presença de peneidinas nos hemócitos de *F. subtilis* foi investigada a partir da amplificação de seqüências de cDNA com o conjunto de iniciadores PEN-Fw e PEN-Rv. Um produto de amplificação com tamanho esperado de 290 pb foi obtido e posteriormente clonado para certificação de sua seqüência (Figura 10).



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação de um fragmento de 290 pb correspondendo potencialmente a uma peneidina (PEN) de *Farfantepenaeus subtilis*. Linha 1: marcador de peso molecular (escala de 100 pb); linha 2: controle negativo sem cDNA; linha 3: *F. subtilis*.

A seqüência nucleotídica referente ao fragmento de cDNA amplificado em *F. subtilis* foi confrontada com bancos de dados, incluindo o banco de dados das peneidinas, PENBASE. A seqüência obtida apresentou alta similaridade com seqüências nucleotídicas de PEN, especialmente com as isoformas pertencentes ao subgrupo 2. Conforme nomenclatura proposta por Gueguen e colaboradores (2006), essa molécula foi então classificada como isoforma 1 da peneidina do subgrupo 2 de *F. subtilis* (*Farsub* PEN2-1) e depositada no GenBank com o número de acesso EF450742. O cDNA de *Farsub* PEN2-1 contém uma ORF (fase/janela aberta de leitura, do inglês *open reading frame*) de 219 pb que codifica para um peptídeo precursor de 73 aminoácidos. A utilização desses iniciadores proporcionou também a identificação, nesse fragmento, de uma região 5' e 3' UTR de 30 e 18 pb, respectivamente (Figura 11).

1	ctccgagcccggttcctcctccgctgccatgcggtctcgtggtctgctggctcttctcctg	60
	<u>M R L V V C L V F L</u>	10
61	gcctccttcgcccctggctcgccaaggccatggctacaagagcggttatacgcgcccgttc	120
11	<u>A S F A L V C Q G H G Y K S G Y T R P F</u>	30
121	tccaggccaccctttggaggaatatataggcccgctcagacctgttgcaatgcatgctac	180
31	<u>S R P P F G G I Y R P V R P V C N A C Y</u>	50
181	agactttcctactcagatgctctcaattgctgcaccaggttcggaaagctgtgtgcacata	240
51	<u>R L S Y S D A L N C C T R F G S C C H I</u>	70
241	agaaaaggataaatagctagatggagaaga	
71	<u>R K G *</u>	

**Figura 11:** Seqüência nucleotídica e aminoacídica deduzida da peneidina *Farsub* PEN2-1 de *Farfantepenaeus subtilis* (GenBank: EF450742). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada e o códon de terminação indicado por asterisco (\*).

Análises realizadas através do programa SignalP indicaram a presença de um peptídeo sinal contendo 19 resíduos de aminoácidos na região amino-terminal da molécula. O sítio de clivagem para a formação do precursor maduro parece estar localizado entre o resíduo glicina da posição 19 e o resíduo histidina da posição 20 (CQG-HG). A alta hidrofobicidade apresentada por essa seqüência parece sinalizar para a tradução de um peptídeo de secreção,



através da via retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi. Após serem sintetizados, esses peptídeos parecem ficar concentrados em grânulos citoplasmáticos de hemócitos granulares, os quais foram facilmente visualizados através da técnica de imunofluorescência indireta (dados não mostrados).

Interessantemente, esse peptídeo possui um resíduo aminoacídico a mais do que usualmente descrito para outras seqüências de PEN2. Normalmente, as isoformas de PEN2 contêm 53 resíduos de aminoácidos em sua composição, com exceção das PEN2 identificadas em *F. paulensis*, que a exemplo de *F. subtilis*, contêm 54 resíduos aminoacídicos. O aminoácido excedente encontrado em *Farsub* PEN2-1 está localizado na posição 21 do peptídeo maduro e refere-se a um resíduo de arginina.

Assim como as demais seqüências de PEN, a forma madura de *Farsub* PEN2-1 possui uma região amino-terminal rica em resíduos de prolina e uma região carboxi-terminal contendo seis resíduos conservados de cisteína. São encontrados também em sua composição onze resíduos aminoacídicos polares carregados positivamente, conferindo a essa molécula um caráter altamente catiônico. Os parâmetros bioquímicos de *Farsub* PEN2-1 estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2:** Parâmetros bioquímicos da peneidina *Farsub* PEN2-1 de *Farfantepenaeus subtilis*.

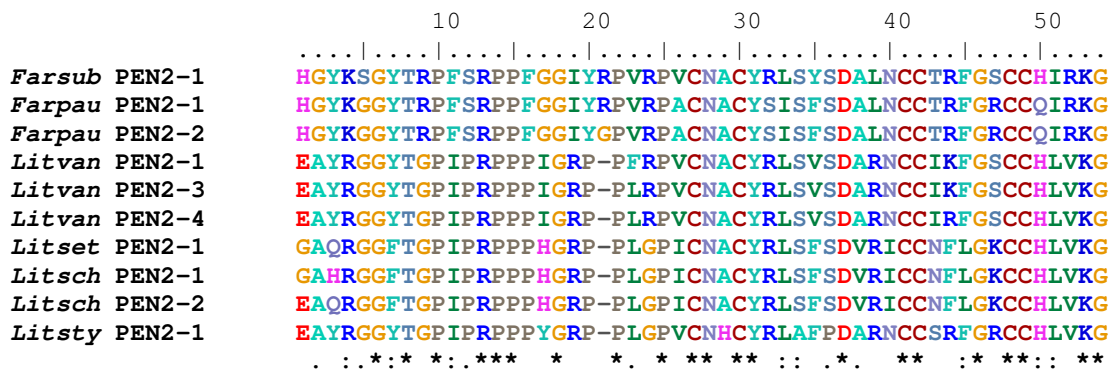
<b>Peneidina</b>	<b>PepSinal</b>	<b>PepMaduro</b>	<b>pI</b>	<b>Mw</b>	<b>aa+</b>	<b>aa-</b>
<i>Farsub</i> PEN2-1	19 aa	54 aa	9,63	6,12	11	01

PepSinal: peptídeo sinal; PepMaduro: peptídeo maduro; pI: ponto isoelétrico teórico; Mw: massa molecular (valores em kDa); aa: resíduos aminoacídicos; aa+: resíduos aminoacídicos carregados positivamente; aa-: resíduos aminoacídicos carregados negativamente.

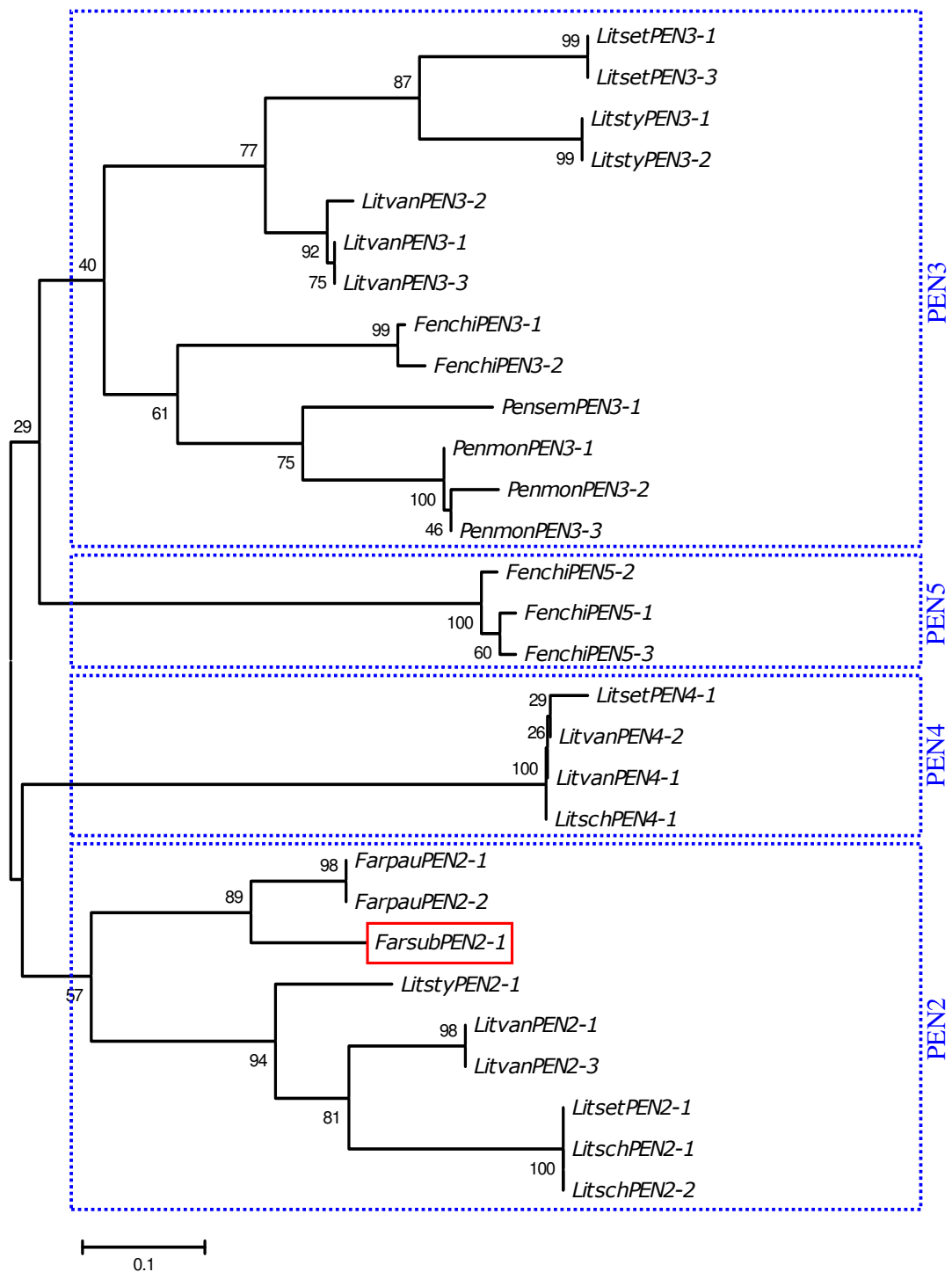
A seqüência aminoacídica deduzida da PEN2 de *F. subtilis* revelou um alto grau de similaridade com as duas isoformas de PEN2 identificadas no camarão *F. paulensis* (91-

93%). *Farsub* PEN2-1 exibiu em média 73% de identidade aminoacídica com as diferentes PEN2 descritas em *L. vannamei* e 65-71% com as isoformas encontradas nos peneídeos *L. schmitti*, *L. setiferus* e *L. stylirostris* (Figura 12). Os 19 resíduos aminoacídicos que constituem a região do peptídeo sinal de *Farsub* PEN2-1 apresentaram 100% de identidade aminoacídica com os demais resíduos presentes na mesma região das diferentes seqüências de peneidinas.

O alinhamento entre os diferentes subgrupos de PEN, presentes em diversas espécies de peneídeos, serviu como base para a construção de filogramas através do software MEGA versão 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004) utilizando o método de *Neighbor-Joining* (1.000 replicatas). A visualização da árvore confirmou a alta similaridade de *Farsub* PEN2-1 com as demais isoformas do subgrupo 2 encontradas em outras espécies de camarões. A figura 13 mostra um filograma dos diferentes subgrupos de PEN, depositados em bancos de dados públicos.



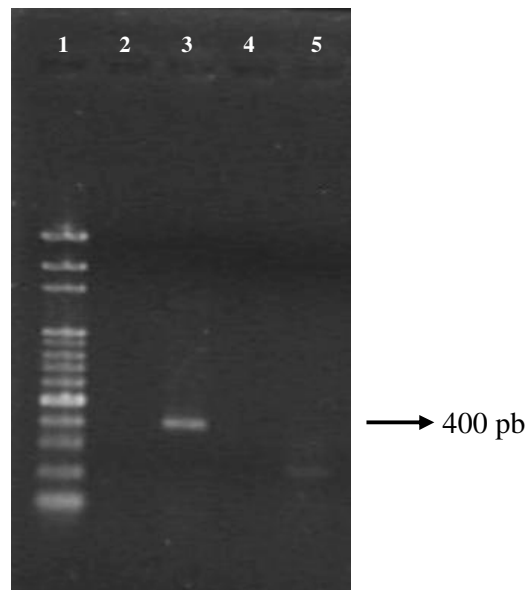
**Figura 12:** Alinhamento múltiplo das seqüências aminoacídicas deduzidas de PEN2 entre *Farfantepenaeus subtilis* e diferentes espécies de peneídeos. As diferentes isoformas de PEN2 estão representadas à esquerda: *Farsub* PEN2-1 (GenBank: EF450742), *Farpau* PEN2-1 e PEN2-2 (AY956416, AY956417); *Litvan* PEN2-1, PEN2-3 e PEN2-4 (Y14925, AF390146, DQ211699); *Litset* PEN2-1 (AY039205); *Litsch* PEN2-1 e PEN2-2 (AY956418, AY956419); *Litsty* PEN2-1 (AY351655). Resíduos idênticos a todas às seqüências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (\*). Os hífens indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:) resíduos pouco e muito similares, respectivamente.



**Figura 13:** Filograma consenso resultante do alinhamento das seqüências aminoacídicas deduzidas dos quatro subgrupos de PEN encontrados em camarões. Os valores presentes em cada nó representam a porcentagem de vezes que um determinado nó ocorreu em 1.000 árvores geradas pelo programa MEGA. Os diferentes subgrupos de PEN encontram-se destacados por meio de caixas pontilhadas em azul e *Farsub* PEN2-1 em caixa vermelha. A barra significa distância.

## 4.2 Fatores Anti-lipopolissacarídeos (ALF)

Através do emprego dos iniciadores específicos ALF-Fw e ALF-Rv foi obtida uma banda de amplificação de aproximadamente 400 pb para a espécie *L. schmitti* (Figura 14). Em relação às duas espécies de camarão-rosa do gênero *Farfantepenaeus*, seqüências semelhantes a ALF não foram detectadas em nenhuma das condições e estratégias testadas, tanto pela utilização dos iniciadores específicos quanto do iniciador antisense *anchor*.



**Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação de um fragmento de 400 pb correspondendo potencialmente para o fator anti-lipopolissacarídeo (ALF) na espécie *Litopenaeus schmitti*. Linha 1: marcador de peso molecular (escala de 100 pb); linha 2: controle negativo sem cDNA; linha 3: *L. schmitti*; linha 4: *Farfantepenaeus paulensis*; linha 5: *Farfantepenaeus subtilis*.

O fragmento de cDNA de aproximadamente 400 pb obtido em *L. schmitti* revelou, após seqüenciamento, alta similaridade aminoacídica com seqüências de ALF entre diferentes espécies de peneídeos, sendo então batizado como *Litsch* ALF e depositado no GenBank com

o número de acesso DQ991357. O fragmento obtido contém uma ORF de 369 pb, seguido por um códon de terminação (TAG), e codifica para um peptídeo com 123 aminoácidos. As seqüências nucleotídica e aminoácídica deduzida estão apresentadas na figura 15.

1	ttcctagtttagaagatg	gcgctctctgtgttgacaagcctgg	gggtggcggtgttctctg	60
		<u>M R V S V L T S L V V A V F L</u>		15
61	gtggcactccttcgccccgagtgccaggctcagggatggcaggctgtggcagcggcgctc	120		
16	<u>V A L F A P E C Q A Q G W Q A V A A A V</u>			35
121	gccagcaagattggtgggttgtggaggaacgaggagacggagctgctcgggcacaagtgt	180		
36	<u>A S K I V G L W R N E E T E L L G H K C</u>			55
181	cgcttcaccgtcaaacccttacatcaagaggttacaactgcactacaaggggaagatgtgg	240		
56	<u>R F T V K P Y I K R L Q L H Y K G K M W</u>			75
241	tgccctgggtggacgcccatcacaggcgaagccaggacgcgcagccactctgggggtgct	300		
76	<u>C P G W T P I T G E A R T R S H S G V A</u>			95
301	ggaaggacggccagggacttcgttcagaaagccttcgagaggggcctcatctccgaacaa	360		
96	<u>G R T A R D F V Q K A F E R G L I S E Q</u>			115
361	gatgctaagcgggtggttgagctcataggccttttgc			
116	<u>D A K R W L S S *</u>			

**Figura 15:** Seqüência nucleotídica e aminoácídica deduzida do fator anti-lipopolissacarídeo *Litsch* ALF de *Litopenaeus schmitti* (Genbank: DQ991357). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada e o códon de terminação indicado por asterisco (\*).

Análises realizadas através do programa SignalP revelaram a presença de um peptídeo sinal e de um peptídeo maduro contendo 25 e 98 aminoácidos, respectivamente. O sítio de clivagem para originar a forma madura apresenta-se entre o resíduo alanina da posição 25 e o resíduo glutamina da posição 26 (CQA-QG). Essa seqüência hidrofóbica de aminoácidos indica que a tradução do peptídeo maduro dá-se através da mesma via sintética e secretória utilizada pelas peneidinas.

Assim como as demais seqüências de ALF, o peptídeo maduro possui dois resíduos de cisteína conservados (na posição 30 e 51). Da mesma forma, a ponte dissulfídica formada entre esses dois resíduos pode gerar uma estrutura em “laço” ou *looping* com a conformação de uma folha- $\beta$  que engloba uma seqüência anfipática de 22 aminoácidos. Os parâmetros bioquímicos de *Litsch* ALF estão apresentados na tabela 3.

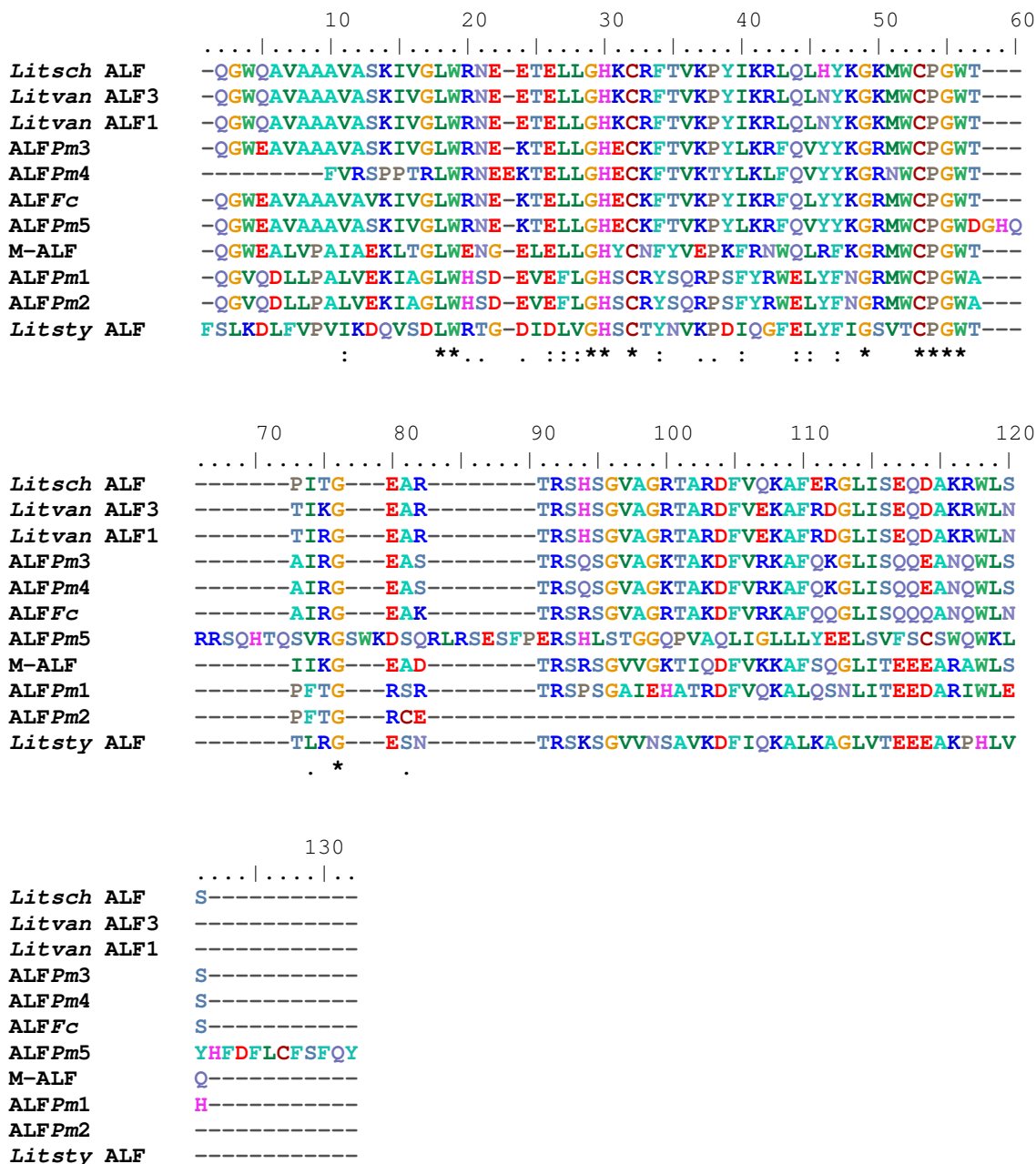
**Tabela 3:** Parâmetros bioquímicos do fator anti-lipopolissacarídeo de *Litsch* ALF de *Litopenaeus schmitti*.

ALF	PepSinal	PepMaduro	pI	Mw	aa+	aa-
<i>Litsch</i> ALF	25 aa	98 aa	10,18	11,14	20	08

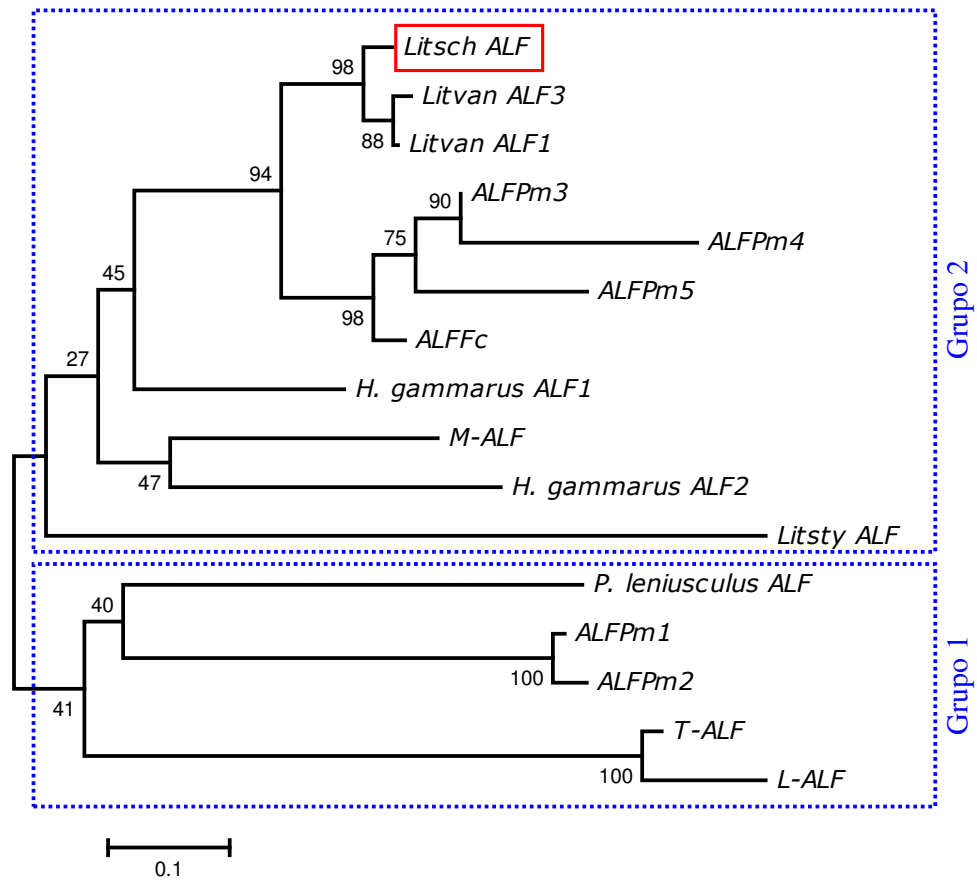
PepSinal: peptídeo sinal; PepMaduro: peptídeo maduro; pI: ponto isoelétrico teórico; Mw: massa molecular (valores em kDa); aa: resíduos aminoácidos; aa+: resíduos aminoácidos carregados positivamente; aa-: resíduos aminoácidos carregados negativamente.

A seqüência aminoacídica deduzida de *Litsch* ALF apresentou similaridades de 60 e 63% com as seqüências de ALF encontradas nas espécies de limúlídeos *L. polyphemus* e *T. tridentatus*, respectivamente. Entre os ALF descritos em camarões, *Litsch* ALF mostrou alta similaridade com *L. vannamei* (95-96%), *F. chinensis* (93%), *M. japonicus* (75%) e com três das isoformas ALFPm3-5 de *P. monodon* (em torno de 75%). Curiosamente, *Litsch* ALF apresentou uma menor similaridade aminoacídica com o ALF de *L. stylirostris* (67%), camarão pertencente ao mesmo gênero. Da mesma maneira, exibiu menor similaridade com outras duas isoformas de *P. monodon*, ALFPm1 e ALFPm2 (em torno de 65%). O alinhamento de diferentes seqüências aminoacídicas de ALF de diferentes camarões está apresentado na figura 16.

Embora a similaridade entre os diferentes ALF seja bastante variada, todas as seqüências para esse PAM apresentam uma região altamente catiônica, composta por 22 aminoácidos, posicionada entre dois resíduos de cisteína conservados. A visualização da árvore filogenética, construída com base no alinhamento aminoacídico de diferentes ALF, permitiu a identificação de dois possíveis grupos de ALF, conforme ilustrado na figura 17.



**Figura 16:** Alinhamento múltiplo das seqüências aminoacídicas deduzidas dos fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF) de *Litopenaeus schmitti* e diferentes espécies de peneídeos. As diferentes isoformas de ALF estão representadas à esquerda: *Litsch* ALF (DQ991357); *Litvan* ALF1 e ALF3 (DQ208701, DQ208703); ALFPm1-5 (BI784449; BI784448; BI784450; BI784451; CF415871); M-ALF (AB210110); *Litsty* ALF (DQ010421). Resíduos idênticos a todas às seqüências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (\*). Os hífen<sup>s</sup> indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:) resíduos pouco e muito similares, respectivamente.

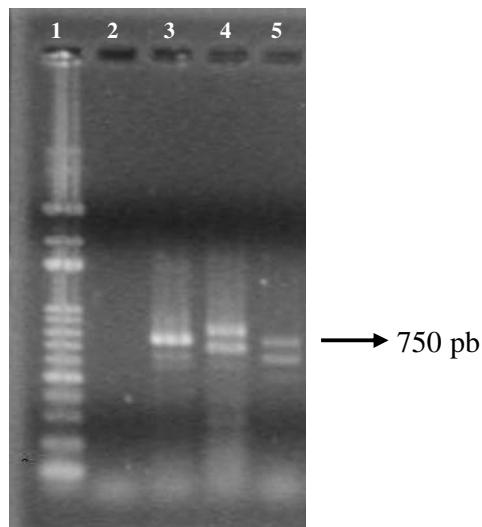


**Figura 17:** Filograma consenso resultante do alinhamento das seqüências aminoacídicas deduzidas de fatores anti-lipopolissacarídeos. Os valores presentes em cada nó representam a porcentagem de vezes que um determinado nó ocorreu em 1.000 árvores geradas pelo programa MEGA. Os dois sugeridos grupos de ALF encontram-se destacados por meio de caixas pontilhadas em azul e *Litsch ALF* em caixa vermelha. A barra significa distância.



### 4.3 Crustinas (CRUS)

Em nenhuma das condições testadas com o conjunto de iniciadores CRUS-Fw e CRUS-Rv, desenhados a partir das diferentes isoformas de CRUS de *L. vannamei* foi possível obter um produto de amplificação com tamanho esperado de 450 pb. Dessa maneira, pesquisou-se a identificação de seqüências semelhantes a crustinas com o iniciador senso CRUS-Fw e o iniciador antisenso *anchor*. A partir de reações otimizadas na presença desses iniciadores, foram então obtidos produtos de amplificação de tamanhos variados para as três espécies de camarões (Figura 18). Os produtos obtidos foram clonados e algumas colônias positivas escolhidas para seqüenciamento.



**Figura 18:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação de seqüências codificantes correspondendo potencialmente para crustinas (CRUS) de diferentes peneídeos a partir dos iniciadores CRUS-Fw e *anchor*. Linha 1: marcador de peso molecular (escala de 100 pb); linha 2: controle negativo sem cDNA; linha 3: *Farfantepenaeus subtilis*; linha 4: *Farfantepenaeus paulensis*; linha 5: *Litopenaeus schmitti*.

Na espécie *F. subtilis* a seqüência de cDNA obtida apresentou alta similaridade com seqüências de CRUS de diferentes espécies de peneídeos. Após identificação e caracterização, a seqüência de crustina presente em *F. subtilis* foi denominada como *Farsub* CRUS e depositada no GenBank com o número de acesso EF450744. A seqüência completa desse peptídeo contém uma ORF de 438 pb que codifica para um precursor de 146 aminoácidos. Esse fragmento de cDNA possui também uma região 3' UTR de 281 pb apresentando uma região consenso para poliadenilação (AATAAA) posicionada 255 nucleotídeos antes da cauda poli(A). A seqüência do precursor protéico de *Farsub* CRUS foi analisada pelo programa SignalP, que indicou um ponto de clivagem entre o resíduo alanina da posição 18 e o resíduo glicina da posição 19 (VLA-GK) (Figura 19). Da mesma forma que observado nos PAM anteriormente descritos, o peptídeo sinal dessa molécula parece dirigir o processamento do peptídeo maduro para grânulos secretórios.

1	gttctggaggcaaccatgaagggcatccaggcgggtgattctgctcggcctcctcacggcg	60
	<u>M K G I Q A V I L L G L L T A</u>	15
61	gttctggcggcaagtttcgtggcttcggaagtcatttggaggcggcgggtgtaggtggc	120
16	<u>V L A G K F R G F G S P F G G G V G G</u>	35
121	ggtttccacggaggcggccttgggtgtaggtggcggccttgggtgtgggaggcggcattgg	180
36	<u>G F H G G G L G V G G G L G V G G G I G</u>	55
181	gttggcaatggcccagcgcactgcaggtattgggtgcaagactccggagggtcaagcctac	240
56	<u>V G N G P S D C R Y W C K T P E G Q A Y</u>	75
241	tgctgcgagtcggcgcacgaaccagagacacctggttggtaccaagccactcgactgcca	300
76	<u>C C E S A H E P E T P V G T K P L D C P</u>	95
301	caagtccgtcccacatgccacgtttcagtgggccccccacaacctggtccaacgactac	360
96	<u>Q V R P T C P R F S G P P T T C S N D Y</u>	115
361	aagtgtgccggcctcgataagtggtgcttcgacaggtggttgggagaaacacgtgtgcaaa	420
116	<u>K C A G L D K C C F D R C L G E H V C K</u>	135
421	cctccctcttttcttcggaagccccttttcggatgaaga <u>aataaa</u> cacgaaagaaatttaa	480
136	<u>P P S F F G K P L F G *</u>	155
481	aggatgaagagaaagaataaatagaccatctgacagacagcctatgttttggaatttgaga	540
541	cctctgatgtactcttcctaattttcagtcctattatttgagagtactattatatgaaaaa	600
601	aagaaagaaaaactaacagggaatgaattctttctttctggttattcatttgattaaca	660
661	tgattttttttttatgtaaattagactgtgttcttctgtcaaaagaaacttaaagaga	720
721	aaaaaaaaaaaaa	

**Figura 19:** Seqüência nucleotídica e aminoacídica deduzida da crustina *Farsub* CRUS de *Farfantepenaeus subtilis* (GenBank: EF450744). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada. O códon de terminação está indicado por asterisco (\*) e a região de poliadenilação destacada por um sublinhado duplo.

A seqüência de cDNA correspondente a CRUS obtida em *F. paulensis* é constituída por uma região 5' UTR de 15 pb, seguida por uma ORF contendo 504 pb. Essa região codifica para um precursor de 168 aminoácidos, contendo um peptídeo sinal e um peptídeo maduro. Segue-se um códon de terminação (TGA) e uma região 3' UTR com 322 pb. Um sinal de poliadenilação (AATAAA) foi identificado 261 nucleotídeos antes da cauda poli(A). Essa seqüência foi então denominada de *Farpau* CRUS e depositada no GenBank com o número de acesso EF182747. Análises realizadas pelo programa SignalP indicam a presença de um peptídeo sinal de 18 aminoácidos idêntico ao da crustina anteriormente descrita. A hidrofobicidade apresentada nessa seqüência sinal sugere fortemente que o peptídeo maduro sofra as mesmas modificações apresentadas pela CRUS descrita em *F. subtilis* (Figura 20).

1	gtactggaggcaaccatgaagggcatccaggcggtgattctgctcggcctcctcacggcg	60
	<u>M K G I Q A V I L L G L L T A</u>	15
61	gttctggccggcaagtttcgtggcttcggaagtcatttggaggcggcggtgtaggtggt	120
16	<u>V L A G K F R G F G S P F G G G G V G G</u>	35
121	ggtttccccggaggcgggtgtaggtgtaggtggcggtttccccggagggtggtattggtgta	180
36	<u>G F P G G G V G V G G G F P G G G I G V</u>	55
181	ggtggcgggtttccccggagctggtattggtgtaggtggcggccttgggtgtgggaggcggc	240
56	<u>G G G F P G A G I G V G G G L G V G G G</u>	75
241	cttggggttggcaatgggcctagtaactgcaggtattggtgcaagactccggagggtcaa	300
76	<u>L G V G N G P S N C R Y W C K T P E G Q</u>	95
301	gcctactgctgtgagtcggcgcacgaaccagagacacctggtggtaccaagccactcgac	360
96	<u>A Y C C E S A H E P E T P V G T K P L D</u>	115
361	tgcccacaagtccgtcccacatgccacgtttcagtgggccccccacaacctgttccaac	420
116	<u>C P Q V R P T C P R F S G P P T T C S N</u>	135
421	gactacaagtgtgctggcctcgataaagtgttgcttcgacaggtgtttgggagaacacgtg	480
136	<u>D Y K C A G L D K C C F D R C L G E H V</u>	155
481	tgcaaacctccctctttcttcggaaagcccccttttcggatgaaga <u>aataaa</u> cacgaaagaa	540
156	<u>C K P P S F F G K P L F G *</u>	
541	atttaaggatgaagagaagaataacagaccatctgacagacagcctatgttttggaaat	600
601	ttgagacctctgatgtactcttcctaattttcagctctattatttgagagtactattatat	660
661	gaaaaaaaaaagaaaaaactaacaggttatgaattcttcttctgttgtattcatttga	780
781	ttaacatgattttttcttatatgtaaatagactgtgttcttctgtcaaaaagaaactta	740
741	aagagaa	840
841	aaaa	

**Figura 20:** Seqüência nucleotídica e aminoacídica deduzida da crustina *Farpau* CRUS de *Farfantepenaeus paulensis* (GenBank: EF182747). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada. O códon de terminação está indicado por asterisco (\*) e a região de poliadenilação destacada por um sublinhado duplo.

O fragmento de cDNA correspondente à crustina de *L. schmitti* (*Litsch* CRUS), depositada no GenBank com o número de acesso EF182748, contém uma ORF de 498 pb que codifica para um precursor de 166 aminoácidos (Figura 21). Esse fragmento de cDNA possui também uma região 3' UTR de 98 pb apresentando uma região consenso para poliadenilação (AATAAA) posicionada 80 nucleotídeos antes da cauda poli(A). Análises realizadas pelo programa SignalP indicam a presença de um peptídeo sinal de características altamente hidrofóbicas. O sítio de clivagem para origem da forma madura apresenta-se entre o resíduo alanina da posição 18 e o resíduo glicina da posição 19 (VLA-GK). Essa seqüência hidrofóbica de aminoácidos indica que a tradução do peptídeo maduro dá-se através da mesma via sintética e secretória relatada para as demais crustinas.

1	gtactggaggcaaccatgaagggcatcaaagcgggtgattctgtgcggcctcttcacggcg	60
	<u>M K G I K A V I L C G L F T A</u>	15
61	gttttggctggcaagtatcgcggttcggacaacccttaggaggtctcgggtgttccagga	120
16	<u>V L A G K Y R G F G Q P L G G L G V P G</u>	35
121	ggcgggtgtaggtgtgggtgtaggtggtcttggtggaggccttgaggaagtcttgg	180
36	<u>G G V G V G V G G G L G G G L G G S L G</u>	55
181	ggaggccttgaggaggtcttggtggaggccttgaggaggtcttggtggaggccttgg	240
56	<u>G G L G G G L G G G L G G G L G G G L G</u>	75
241	ggtagtcatggcacaagcgaactgcaggatattggtgcaagactccggagggtcaagcctac	300
76	<u>G S H G T S D C R Y W C K T P E G Q A Y</u>	95
301	tgctgcgagtcggcccacgaaccagagacacctggttggtaccaagctcctcgactgcca	360
96	<u>C C E S A H E P E T P V G T K L L D C P</u>	115
361	caagtcggtcccacatgccacggtttccatgggccccccacgacgtgttccaacgactac	420
116	<u>Q V R P T C P R F H G P P T T C S N D Y</u>	135
421	aagtgtgctggcctcgataagtggtgcttcgacaggtgttgggagaacacgtgtgcaag	480
136	<u>K C A G L D K C C F D R C L G E H V C K</u>	155
481	cctccttcgctcttcggacagcaaattttcggatgaaga <u>aataaa</u> cgaaagaattttaag	540
156	<u>P P S L F G Q Q I F G *</u>	
541	gatgaagagaaagaatacaagaccatctgaaggacgaccgatgttttgatttgattgaa	600
601	aaaaaaaaaaaaa	

**Figura 21:** Seqüência nucleotídica e aminoacídica deduzida da crustina *Litsch* CRUS de *Litopenaeus schmitti* (GenBank: EF182748). A região do peptídeo sinal encontra-se sublinhada. O códon de terminação está indicado por asterisco (\*) e a região de poliadenilação destacada por um sublinhado duplo.

As três seqüências de crustinas identificadas contêm uma região rica em resíduos de glicina na porção amino-terminal do peptídeo maduro. A região carboxi-terminal dessas seqüências possuem ainda uma porção de 12 resíduos de cisteína participando na formação de pontes dissulfídicas, onde também é possível identificar um domínio conservado WAP. Os parâmetros bioquímicos das crustinas das três espécies de peneídeos nativos estão apresentados na tabela 4.

**Tabela 4:** Parâmetros bioquímicos das crustinas de *Farfantepenaeus subtilis* (*Farsub* CRUS), *Farfantepenaeus paulensis* (*Farpau* CRUS) e *Litopenaeus schmitti* (*Litsch* CRUS).

Crustina	PepSinal	PepMaduro	pI	Mw	aa+	aa-
<i>Farsub</i> CRUS	18 aa	128 aa	8,03	13,00	15	10
<i>Farpau</i> CRUS	18 aa	150 aa	8,29	14,67	14	09
<i>Litsch</i> CRUS	18 aa	148 aa	7,62	14,52	15	10

PepSinal: peptídeo sinal; PepMaduro: peptídeo maduro; pI: ponto isoelétrico teórico; Mw: massa molecular (valores em kDa); aa: resíduos aminoácidos; aa+: resíduos aminoácidos carregados positivamente; aa-: resíduos aminoácidos carregados negativamente.

As seqüências de crustina identificadas neste estudo apresentaram similaridade nucleotídica variada. Como esperado, as CRUS das espécies pertencentes ao gênero *Farfantepenaeus* apresentaram uma alta identidade aminoacídica entre si (96%). Uma das mais marcantes características da *Farpau* CRUS é a presença de uma grande quantidade de repetições de resíduos de glicina em sua porção amino-terminal. As seqüências de *F. subtilis* e *F. paulensis* demonstraram maior similaridade aminoacídica com as seqüências de *L. vannamei* (em torno de 86-90%), *L. setiferus* (81-84%) e *L. schmitti* (79-82%).

Em relação à *Litsch* CRUS, o alinhamento entre diferentes seqüências de crustinas presentes em peneídeos indicou uma alta similaridade com espécies pertencentes ao gênero *Litopenaeus*. A identidade aminoacídica entre essa seqüência de CRUS com as encontradas em *L. setiferus* e *L. vannamei* foi de 98 e 86%, respectivamente. Similaridades significativas

também foram encontradas com as espécies *F. subtilis* (82%), *F. paulensis* (79%) e *M. japonicus* (72%). A figura 22 apresenta o alinhamento das seqüências aminoacídicas deduzidas de crustinas dos três camarões nativos com crustinas de diferentes peneídeos e serviu como base para a construção de filogramas. A visualização da árvore confirmou a alta similaridade das seqüências de CRUS obtidas com as diferentes isoformas identificadas entre as espécies de camarões (Figura 23).

```

          10         20         30         40         50         60
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
crustin Ls1      -----G-----PGGFPGG-----
crustin Ls3      -----GPGGFSGGVPPG--FPGG--RPGGFPGG-----
crusPm1          -----QSWHGGRPGG--FPGGG--RPGGFPGGGRPGG-----
crusMj1          GKLR-FVRSFGGGYGGGVGGVHGGGLGNNGFGGVQGGVGGVHGGGLGNNGFG-----
crusMj2          GKLR-FVRSFGGGYGGGVGGVHGGGLGNNGFGGVQGGVGGVHGGGLGNNGFGGVQGGVGG-----
crusMj5          GKLR-FVRSFGGGYGGGVGGVHGGGI GNNGFGGVQGGVGGVHGGGLGNNGFG-----
Farsub CRUS     GKFRGFGSPFPGG--GGVGGGFHGG-----
Farpau CRUS     GKFRGFGSPFPGG--GGVGGGFPGGGVGVG--GGFPGGGIGVGGGF-----
crustin Lv1     GKFRGFGQPFPGG--LGG---PGGVGVG--GGFPGGGLG-----
crustin Lv5     GKFRGFGQPFPGG--LGG---PGGVGVG--GGFPGGGLG-----
crustin Lv3     GKFRGFGQPFPGG--LGG---PGGVGVG--GGFPGGGLG-----
Litsch CRUS     GKFRGFGQPLGG--LGV---PGGVGVVGGGLGGGLGGS-----
crustin Ls2     GKFRGFGQPLGG--LGV---PGGVGVVGGGLGGGLGGG-----
CruFc           -QNKDDTRFLGG-----VPGVG-----GGFVPG-----

```

```

          70         80         90         100        110        120
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
crustin Ls1      -----VPGRFP-----SATA
crustin Ls3      -----VPGGFP-----SATA
crusPm1          -----RPGGFP-----SVTA
crusMj1          -----GGFGGGFGGPQGGGFGLQGGGFG-----GLQGGGLGGS
crusMj2          VHGGGLGNNGFGGGFGGFGGPQGGGFGLQGGGFGG-----LQGGGFGGLQGGGLGGS
crusMj5          -----GGFGGGFGGPQGGGFG-----GLQGGGLGGS
Farsub CRUS     -----GLG--VGGGLG-----VGGIGVGN
Farpau CRUS     -----PGAGIG--VGGGLG-----VGGIGVGN
crustin Lv1     -----VGGGLG--VGGGLG-----VGGGLGVGGGLGT
crustin Lv5     -----VGGGLG--VGGGLG-----VGGGLGVGGGLGT
crustin Lv3     -----VGGGLG--VGG-----GLGT
Litsch CRUS     -----LGGGLGGGLGGGLG-----GGLGGGLGGSH
crustin Ls2     -----LGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGGLGGSH
CruFc           -----VPGHGG-----VAPV

```

\*

```

          130        140        150        160        170        180
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
crustin Ls1      PPATCRRWCKTPEAQAYCCE TIFEPEAPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFHGP--PVTCSND
crustin Ls3      PPATCRRWCKTPEAQAYCCE TIFEPEAPVGT KPLDCPQVRPTCPPTRFGR--PVTCSND
crusPm1          PPASCRRWCETPENAFYCCESRYEPEAPVGT KILDCPKVRDTCPPVRF LAVEQVPCSSD
crusMj1          GSSDCRYWCKTPGGQNYCCERSHEPEGPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFQGGG--PVTCSND
crusMj2          GSSDCRYWCKTPGGQNYCCERSHEPEGPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFQGGG--PVTCSND
crusMj5          GSSDCRYWCKTPGGQNYCCERSHEPEGPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFQGGG--PVTCSND
Farsub CRUS     GPSDCRYWCKTPEGQAYCCESAHEPETPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFSGP--PTTCSND
Farpau CRUS     GPSDCRYWCKTPEGQAYCCESAHEPETPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFSGP--PTTCSND
crustin Lv1     GTSDCRYWCKTPEGQAYCCESAHEPETPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFHGP--PTTCSND
crustin Lv5     GTSDCRYWCKTPEGQAYCCESAHEPETPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFHGP--PTTCSND
crustin Lv3     GTSDCRYWCKTPEGQAYCCESAHEPETPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFHGP--PTTCSND
Litsch CRUS     GTSDCRYWCKTPEGQAYCCESAHEPETPVGT KLLDCPQVRPTCP--RFHGP--PTTCSND
crustin Ls2     GTSDCRYWCKTPEGQAYCCESAHEPETPVGT KPLDCPQVRPTCP--RFHGP--PTTCSND
CruFc           GGLVPGGGGLIPGGGFECNYCRTRYGVVCKPGRCPVVRDVCPLRQGV-----ICRQD
          .           .           : * :           * *           ** ** . ** *           * . *

```

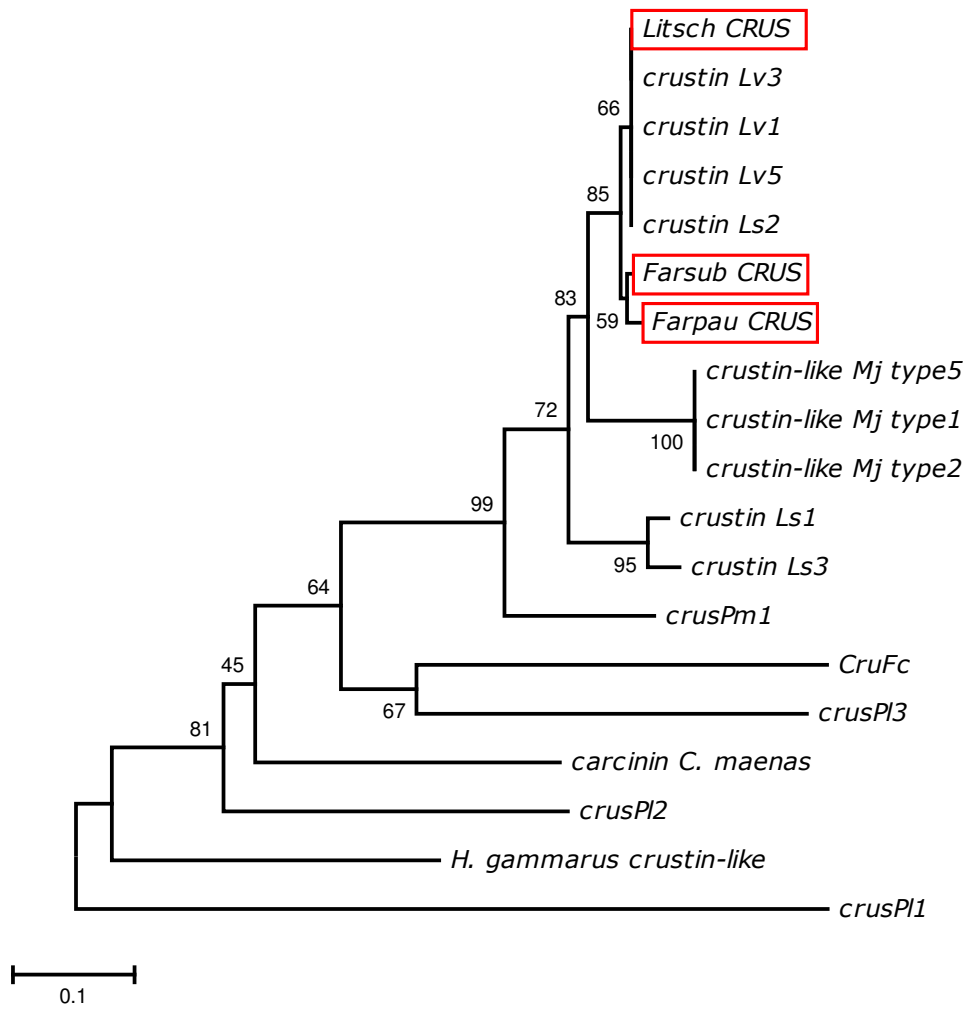
```

                                190      200      210
                                ....|....|....|....|....|....|..
crustin Ls1      YKCGGVDKCCFDRCLGEHVCKPPSFY--SQFP
crustin Ls3      YKCGGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFY--SQFR
crusPm1         YKCGGLDKCCFDRCLGQHVCKPPSFY--EFAA
crusMj1         YKCAGIDKCCFDTCLQEHVCKPPSVFGKPLFG
crusMj2         YKCAGIDKCCFDTCLQEHVCKPPSVFGKPLFG
crusMj5         YKCAGIDKCCFDTCLQEHVCKPPSVFGKPLFG
Farsub CRUS    YKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGKPLF-
Farpau CRUS    YKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGKPLFG
crustin Lv1     YKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGSQVFG
crustin Lv5     YKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGSQVFG
crustin Lv3     YKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGSQVFG
Litsch CRUS    YKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSLFGQQIFG
crustin Ls2     YKCAGLDKCCFDRCLGEHVCKPPSFFGQQIFG
CruFc          TDCFGSDKCCYDVCLNDTVCKPIVLGSEG---
                . * * * * * : * * * : * * * * .

```

**Figura 22:** Alinhamento múltiplo das seqüências aminoacídicas deduzidas de crustinas (CRUS) de diferentes espécies de peneídeos, incluindo as três espécies nativas. As diferentes isoformas de CRUS estão representadas à esquerda: crustin *Ls1-3* (AF430077; AF430078; AF430079); crustin *Lv1*, *Lv3* e *Lv5* (AF430071; AF430073; AF430075); crus*Mj1*, *Mj2* e *Mj5* (AB121740; AB121741; AB121744); crus*Pm1* (CD766060); *Farsub* CRUS (GenBank: EF450744); *Farpau* CRUS (EF182747); *Litsch* CRUS (EF182748); *CruFc* (DQ097703). Resíduos idênticos a todas às seqüências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (\*). Os hífen indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:) resíduos pouco e muito similares, respectivamente.





**Figura 23:** Filograma consenso resultante do alinhamento das seqüências aminoacídicas deduzidas de crustinas (CRUS) de diferentes espécies de crustáceos. Os valores presentes em cada nó representam a porcentagem de vezes que um determinado nó ocorreu em 1.000 árvores geradas pelo programa MEGA. *Farsub CRUS*, *Farpau CRUS* e *Litsch CRUS* encontram-se destacados por meio de caixas. A barra significa distância.

Sumarizando, através das metodologias descritas, foi possível identificar e caracterizar seqüências codificadoras para três classes de PAM: **peneidinas** em *F. subtilis* (GenBank: EF450742), **fator anti-lipopolissacarídeo** em *L. schmitti* (GenBank: DQ991357) e **crustinas** nas três espécies de camarões estudadas, *F. subtilis* (GenBank: EF450744), *F. paulensis* (GenBank: EF182747) e *L. schmitti* (GenBank: EF182748). Com base nas seqüências das moléculas obtidas e em seqüências semelhantes disponíveis em bancos públicos foi ainda possível elaborar filogramas, comparando estas seqüências com diferentes espécies de invertebrados marinhos.

## 5. DISCUSSÃO

Assim como mencionado anteriormente, os peptídeos antimicrobianos (PAM) são um dos principais efetores imunológicos do sistema imune inato de invertebrados, vertebrados e plantas. No presente estudo, a detecção de PAM por abordagem molecular (RT-PCR), permitiu identificar seqüências codificadoras para três classes de peptídeos a partir dos hemócitos de três espécies nativas de camarões peneídeos: peneidinas (PEN), fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF) e crustinas (CRUS).

As peneidinas compõem uma família de peptídeos antimicrobianos, inicialmente isoladas do peneídeo *L. vannamei* (DESTOUMIEUX et al., 1997), e que têm sido amplamente identificadas entre diferentes espécies de camarões marinhos (ROJTINNAKORN et al. 2002; CUTHBERTSON et al., 2002; MUÑOZ et al., 2004; KANG et al., 2004), incluindo as espécies nativas brasileiras *F. paulensis* e *L. schmitti* (BARRACCO et al., 2005). Como já destacado, estas moléculas são particularmente ativas contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos (DESTOUMIEUX et al., 1999).

Para identificação de seqüências similares a PEN nos hemócitos do camarão-rosa *Farfantepenaeus subtilis*, foram utilizados iniciadores desenhados a partir de seqüências consenso para os diferentes subgrupos de PEN descritos. Seis diferentes clones foram seqüenciados, em ambas as direções, e suas seqüências comparadas a fim de se detectar redundâncias. Após as análises, verificou-se 100% de identidade aminoacídica entre as seqüências geradas. A seqüência de PEN obtida em *F. subtilis* apresentou alta similaridade com diferentes seqüências de PEN pertencentes ao subgrupo 2. Assim como observado nas espécies nativas *F. paulensis* e *L. schmitti*, não foram identificadas em *F. subtilis* seqüências de PEN pertencentes ao subgrupo 3 (BARRACCO et al., 2005). Estudos realizados em diferentes espécies de camarões têm demonstrado que as PEN3 são usualmente as mais

expressas em seus hemócitos, e dessa maneira as mais abundantemente detectadas por diferentes metodologias (CUTHBERTSON et al., 2002). Interessantemente, nenhuma das espécies do Atlântico Sul, cujas seqüências de PEN são conhecidas, apresentaram em seus hemócitos seqüências semelhantes às isoformas do subgrupo 3.

Os iniciadores desenvolvidos para a detecção dessas moléculas nessas espécies foram desenhados com base em seqüências consenso para os todos os diferentes subgrupos de PEN, incluindo PEN3. Essa característica dos iniciadores desenhados, de ligar especificamente a qualquer uma das isoformas de PEN, não deveria preferir qualquer uma delas, sendo apenas estatisticamente mais provável a ligação com isoformas relativamente mais expressas. Os resultados encontrados em *F. subtilis*, assim como em *F. paulensis* e *L. schmitti* (BARRACCO et al., 2005) sugerem que os camarões brasileiros possuam uma expressão majoritária de PEN2, o que não foi usualmente descrito para outras espécies de camarões. Por outro lado, é ainda possível, que essas espécies nativas possam não conter o gene codificante para a isoforma 3, uma vez que cada uma das isoformas de PEN é transcrita por um gene diferente (O'LEARY; GROSS, 2006). A possível ausência de PEN3 nos camarões brasileiros poderia ser melhor elucidada através do uso de sondas gênicas específicas para PEN3, o que poderá ser realizado em análises futuras.

Uma característica interessante de *Farsub* PEN2-1, também encontrada nas duas isoformas de PEN identificadas em *F. paulensis*, é a presença de um resíduo aminoacídico excedente na posição 21 do peptídeo maduro. As isoformas *Farsub* PEN2-1 e *Farpau* PEN2-1 possuem uma arginina como resíduo excedente e a isoforma *Farpau* PEN2-2, um resíduo de glicina (BARRACCO et al., 2005). A presença do resíduo excedente de arginina na PEN2 de *F. subtilis* e em uma das PEN2 de *F. paulensis*, confere a essas moléculas um número maior de resíduos carregados positivamente em sua composição, o que está intimamente associado

ao elevado caráter catiônico do peptídeo. Essas duas isoformas apresentaram, dentro desse subgrupo, os maiores pontos isoelétricos teóricos (em torno de 9,6).

Até o presente momento, 11 diferentes isoformas de PEN2 foram identificadas em diferentes espécies de camarões. Curiosamente, todas as PEN descritas possuem uma seqüência sinal muito conservada. Embora os diferentes peptídeos sinais gerados por genes polimórficos apresentem características bioquímicas semelhantes, não são usualmente encontrados na natureza peptídeos sinais com seqüências tão conservadas (NOTHWEHR; GORDON, 1990). Análises entre as diferentes seqüências de PEN revelaram que *Farsub* PEN2-1 possui uma alta similaridade aminoacídica entre todas as PEN do subgrupo 2, especialmente com as isoformas do camarão-rosa *F. paulensis* (91-93%), o que era esperado para espécies pertencentes ao mesmo gênero.

Foi possível observar também que todos os diferentes subgrupos de PEN (PEN2-5) estão bastante relacionados entre si, uma vez que mesmo possuindo composições aminoacídicas variadas, todas as isoformas possuem uma região amino-terminal rica em resíduos de prolina e uma região carboxi-terminal contendo seis resíduos conservados de cisteína. A partir dessas características em comum, foi possível designar uma assinatura única para todos os subgrupos de PEN (GUEGUEN et al., 2006). Tal evidência foi confirmada através de análise da árvore filogenética gerada através do programa MEGA e embasa a hipótese que os diferentes genes de PEN encontrados em um único indivíduo sejam parálogos, ou seja, tenham sido originados por duplicação gênica (O'LEARY; GROSS, 2006).

Inicialmente, acreditava-se que as PEN fossem ubíquas entre os diferentes grupos de crustáceos. Entretanto, não foram detectadas moléculas semelhantes à PEN em nenhuma espécie que não fosse pertencente à Família Penaeidae. A fim de constatar a ubiquidade dessas moléculas entre outros grupos camarões, investigou-se a presença de PEN em duas

espécies de camarões de água doce da Família Palaemonidae (*Macrobrachium olfersi* e *M. potiuna*). Para tal, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta, com anticorpos policlonais produzidos contra a peneidina 3 de *L. vannamei* (anti-*Litvan* PEN3), e também detecções por RT-PCR, com os mesmos iniciadores direcionados para as regiões de consenso das PEN (dados não mostrados). Em nenhuma das metodologias empregadas foi possível detectar sinais da presença de peneidinas em outros grupos de camarões não pertencentes à Família Penaeidae. Cabe ressaltar, que os anticorpos anti-*Litvan* PEN3 de *L. vannamei* reagiram fortemente com os grânulos dos hemócitos de *F. paulensis* e *L. schmitti* (BARRACCO et al., 2005), mostrando que estas moléculas têm capacidade de reagir de forma cruzada com peneidinas de outras espécies de peneídeos e possivelmente com outros subgrupos que não apenas a peneidina 3. Esses resultados sugerem que as PEN surgiram como uma novidade evolutiva para os peneídeos, não tendo sido encontrado um gene ortólogo, até o presente momento, em nenhum outro grupo de crustáceos filogeneticamente associado.

Seqüências semelhantes aos fatores anti-lipopolissacarídeos encontrados em limulídeos foram inicialmente descritos nos hemócitos de duas espécies de camarões peneídeos através de abordagem genômica (GROSS et al., 2001; SUPUNGUL et al., 2002). Embora haja um número crescente de seqüências de ALF sendo depositadas em bancos de dados virtuais muito recentemente (a partir de 2005), apenas dois trabalhos referem o papel biológico desempenhado por esse efector imunológico. Como anteriormente ressaltado, o ALF é uma molécula de atividade antimicrobiana potente e de amplo espectro, sendo ativa contra bactérias Gram-positivas e negativas e fungos filamentosos e tendo a propriedade de se ligar e neutralizar LPS (SOMBOONWIWAT et al., 2005; NAGOSHI et al., 2006). Neste contexto, a

seqüência gênica clonada do ALF de *L. schmitti* está atualmente em processo de expressão em sistema recombinante, para posterior avaliação de sua atividade e espectro antimicrobiano.

Através da técnica de RT-PCR foi obtida uma seqüência de aproximadamente 400 pb na espécie *L. schmitti*, bastante similar a outras seqüências de ALF descritas para peneídeos. Entretanto, não foi possível amplificar seqüências semelhantes nas duas espécies do gênero *Farfantepenaeus* com os mesmos iniciadores utilizados para *L. schmitti*. Contudo, seqüências parciais de ALF foram identificadas em *F. subtilis* e *F. paulensis* utilizando novos pares de iniciadores direcionados para regiões mais internas do ALF de outros peneídeos (dados não mostrados). Esse resultado sugere que as seqüências nucleotídicas encontradas nessas espécies não sejam tão similares à isoforma 3 de *P. monodon*, cuja seqüência serviu de base para a confecção dos iniciadores inicialmente utilizados. A utilização de iniciadores desenhados a partir de seqüências nucleotídicas de algumas espécies pode, por ventura, não servir para a amplificação de seqüências similares em outras espécies. Esse fato pode estar relacionado a possíveis diferenças entre as seqüências ou nos níveis de expressão desse gene nos camarões nativos (URBAN; ROZENTAL; SPRAY, 1999).

A seqüência de ALF obtida em *L. schmitti*, assim como outras seqüências de ALF, é composta por aproximadamente 100 resíduos aminoacídicos. A única exceção dentro dessa classe de PAM refere-se à isoforma ALFPm2 de *P. monodon*, que é composta por aproximadamente 60 aminoácidos (SUPUNGUL et al., 2004). A quase totalidade das seqüências de ALF, incluindo *Litsch* ALF, apresenta ponto isoelétrico teórico em torno de 10, o que confere a essas moléculas um caráter altamente catiônico. (SOMBOONWIWAT et al., 2005; LIU et al., 2005). Essa característica pode se refletir no seu papel biológico, como condição para uma melhor interação com estruturas aniônicas da superfície de microrganismos (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

Análises estruturais do ALF encontrado no limulídeo *L. polyphemus* (L-ALF) demonstraram a presença de uma estrutura terciária cíclica na conformação de grampo ( $\beta$ -hairpin) que concentra uma seqüência alternada de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos entre dois resíduos de cisteína (HOESS et al., 1993). A comparação dessa região do L-ALF com a seqüência correspondente no ALF de diferentes espécies de camarões, incluindo *L. schmitti*, revelou grande similaridade nesse padrão de alternância de resíduos. Essa estrutura em forma de grampo, formada pela ponte dissulfídica entre dois resíduos de cisteína presentes nas posições 30 e 51 de *Litsch* ALF, sugere que essa molécula também possua atividade de ligação a LPS. Ensaio realizado com a estrutura em grampo do ALF do peneídeo *M. japonicus*, bastante similar ao encontrado em *L. schmitti*, demonstraram uma clara atividade de neutralização de LPS. Esses dados sugerem fortemente que em camarões essas moléculas também exerçam uma função importante no controle de LPS, além de desempenharem uma efetiva atividade antimicrobiana (NAGOSHI et al., 2006).

O alinhamento múltiplo das seqüências aminoacídicas deduzidas de ALF mostraram que *Litsch* ALF possui uma alta similaridade com seqüências de ALF de *L. vannamei*, *F. chinensis* e com ALFPm3, isoforma mais abundantemente expressa em *P. monodon*. A alta semelhança entre essas isoformas pode estar consistentemente associada à escolha da seqüência que serviu de base para a confecção dos iniciadores. Interessantemente, foi observada uma similaridade aminoacídica relativamente baixa entre *Litsch* ALF e o ALF de *L. stylirostris*, um camarão peneídeo pertencente ao mesmo gênero. A razão para esse caso pode estar relacionada ao fato desses camarões poderem apresentar diferentes isoformas para um mesmo peptídeo. Dessa maneira, os ALF encontrados nesses dois camarões podem provavelmente pertencer a grupos de isoformas distintas, como observado em *P. monodon* (SUPUNGUL et al., 2004). Nessa espécie, foram identificadas 5 diferentes isoformas, entre as quais apenas uma (ALFPm3) possui identidade maior com *Litsch* ALF.



Análises filogenéticas realizadas entre as diferentes isoformas encontradas em *P. monodon* sugerem que os genes envolvidos na transcrição de mRNA para ALF, nessa espécie, estejam alocados em dois diferentes *loci* (SUPUNGUL et al., 2004). Segundo os mesmos autores, ALFPm1-2 seriam alelos de um dos *locus*, enquanto as isoformas ALFPm3-5 alelos de outro. Acredita-se que o polimorfismo encontrado entre as diferentes isoformas de um mesmo gene seja resultado de *splicing* alternativo de diferentes *exons* presentes nas regiões amino e carboxi-terminal dos genes codificantes para os ALF de *P. monodon*.

A visualização do filograma gerado a partir do alinhamento de seqüências aminoacídicas de ALF entre diferentes espécies de crustáceos e limulídeos sugere a existência de dois diferentes grupos gênicos. Em um desses dois grupos estariam os ALF de limulídeos, do lagostim *P. leniusculus* e duas isoformas encontradas em *P. monodon* (ALFPm1-2) e, no outro grupo, os ALF de *H. gammarus* e das demais espécies de camarões. Os limulídeos pertencem a um grupo de quelicerados bastante antigo e por muito tempo têm sido utilizados como modelo biológico para estudos sobre sistema imune inato (IWANAGA; KAWABATA, 1998). Pelo fato de formarem um grupo filogeneticamente mais antigo, propõe-se que os fatores anti-lipopolissacarídeos tenham surgido num ancestral comum a esses grupos, distribuindo-se também para os crustáceos incluindo camarões. O ALF destaca-se notavelmente no sistema imunológico de crustáceos pelo seu amplo espectro de ação antimicrobiana (WANG et al., 2002; SOMBOONWIWAT et al., 2005).

Analisando sob essa perspectiva, um dos genes codificantes para o ALF de camarões poderia ter surgido a partir de um ancestral comum com os limulídeos, sendo o outro gene (não presente em limulídeos) proveniente de duplicação gênica com posteriores mutações. Todavia, na literatura e nos bancos de dados públicos existem pouquíssimos relatos sobre seqüências de ALF em diferentes espécies de artrópodos, assim como estudos a respeito da estrutura genômica e da regulação transcricional das moléculas de ALF. Desse modo, estudos

genômicos em diferentes grupos de invertebrados necessitam ainda ser realizados para a confirmação dessas hipóteses. Das classes de PAM descritas em crustáceos, somente as PEN foram caracterizadas nesse nível molecular (O'LEARY; GROSS, 2006).

A terceira classe de PAM identificada nas três espécies nativas de camarões refere-se a moléculas bastante similares ao peptídeo de 11,5 kDa inicialmente isolado dos hemócitos granulares do caranguejo *C. maenas*. Como mencionado anteriormente, este peptídeo apresentou uma atividade antimicrobiana restrita, apenas contra bactérias Gram-positivas marinhas (RELF et al., 1999).

Todas as seqüências obtidas nesse estudo, em camarões nativos, codificam para precursores contendo uma seqüência de peptídeo sinal, seguida por uma região amino-terminal hidrofóbica rica em resíduos de glicina e uma região carboxi-terminal contendo 12 resíduos conservados de cisteína, onde se encontra um domínio WAP. Esse padrão molecular, dentro dessa classe de PAM, foi encontrado somente entre as seqüências de peneídeos e essas moléculas foram denominadas *crustinas* (BARTLETT et al., 2002).

Uma característica bastante marcante encontrada nas CRUS de camarões, que se mostra ausente em seqüências similares descritas em crustáceos pleociematos (caranguejos e lagostas), é a presença de uma porção hidrofóbica rica em resíduos de glicina na região amino-terminal da molécula. Entre as CRUS identificadas nos três camarões nativos, *Farpau* CRUS apresentou uma maior seqüência repetida de glicinas. A quantidade de resíduos repetidos desse aminoácido mostra-se bastante variável entre as diferentes espécies de peneídeos, sendo as quantidades repetidas de glicinas, as reponsáveis pelo aumento proporcional do tamanho de cada isoforma (RATTANACHAI et al., 2004; VARGAS-ALBORES et al., 2004). Até o presente momento, a possível função desempenhada por essa seqüência presente na região amino-terminal é ainda desconhecida. Especula-se apenas que

essa região hidrofóbica possa estar relacionada a uma provável localização na membrana (bicamada lipídica) dos grânulos dos hemócitos (BARTLETT et al., 2002).

Em contraste à região amino-terminal, as três seqüências de CRUS obtidas apresentaram uma região carboxi-terminal conservada, encontrada em muitos crustáceos. Essas seqüências apresentam 12 resíduos de cisteína conservados que se encontram posicionados do mesmo modo que as isoformas de *C. maenas* e da quase totalidade das CRUS de peneídeos. A única exceção para esse padrão, em camarões, foi identificada em uma isoforma de *P. monodon* (CHEN; PAN; KUO, 2004a). Contudo, todas as seqüências de crustinas/carcininas descritas contêm, nessa região, 8 resíduos de cisteína compondo um domínio WAP (HAUTON; BROCKTON; SMITH, 2006).

Moléculas contendo um domínio WAP são primariamente conhecidas como inibidores de serino proteases, as quais incluem algumas famílias de proteínas como as elafinas (RANGANATHAN et al., 1999). Proteínas com atividade inibitória de proteases presentes na hemolinfa de crustáceos podem desempenhar inúmeras funções de defesa. Esse grupo de moléculas auxilia na inibição de muitas proteases microbianas, podendo também combater muitas infecções fúngicas (JIANG; KANOST, 1997; POLANOWSKI et al., 1997). Inibidores de proteases também são necessários na regulação de alguns processos imunológicos presentes no sistema imune inato de crustáceos, como geralmente ocorre na ativação do sistema pró-fenoloxidase (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004). Embora a presença desse domínio nas CRUS de diferentes espécies de crustáceos esteja bem comprovada, não existem ainda estudos que confirmem a atividade funcional desta região nessas moléculas.

As seqüências aminoacídicas das CRUS identificadas nas três espécies de peneídeos nativos apresentaram variação na quantidade de resíduos aminoacídicos presentes no peptídeo maduro. A seqüência obtida na espécie *F. subtilis* apresentou 127 resíduos aminoacídicos em sua composição, sendo relativamente menor quando comparada às seqüências de *L. schmitti* e

*F. paulensis*, que são compostas por 148 e 150 resíduos, respectivamente. Como anteriormente mencionado, o tamanho de cada isoforma de CRUS está intrinsecamente relacionado ao conteúdo de glicinas presentes na região amino-terminal.

Por outro lado, a presença de glicinas não confere carga ao peptídeo maduro, uma vez que esse aminoácido possui características apolares. As diferentes CRUS de peneídeos mostram-se como moléculas catiônicas, porém com ponto isoelétrico teórico ( $pI < 8,1$ ) inferior a outras classes de PAM de crustáceos (DESTOUMIEUX et al., 1997; HERBINIÈRE et al., 2005). Este fato pode explicar o porquê destas moléculas apresentarem uma atividade antimicrobiana mais reduzida e de baixo espectro. Efetivamente, peptídeos fortemente catiônicos interagem mais facilmente com as membranas de microrganismos, devido à grande afinidade por fosfolipídios aniônicos comumente encontrados nas suas membranas. Sendo assim, a baixa carga positiva das crustinas, comparativamente às outras classes de PAM de crustáceos, poderia refletir no seu reduzido espectro de atividade antimicrobiana.

O alinhamento entre as três seqüências aminoacídicas obtidas de CRUS e outras seqüências presentes em diferentes crustáceos revelou padrões de similaridade bastante variáveis entre as seqüências. Como esperado para espécies pertencentes ao mesmo gênero, observou-se uma alta identidade entre *Farsub* CRUS e *Farpau* CRUS (96%). Ambas seqüências apresentaram identidade inferior quando comparadas à seqüência aminoacídica de *Lisch* CRUS (79 e 82% para *Farpau* CRUS e *Farsub* CRUS, respectivamente). Entretanto, as três seqüências apresentaram uma alta similaridade com as diferentes isoformas do camarão *L. vannamei* (em torno de 85%). A alta semelhança entre as CRUS identificadas com seqüências de *L. vannamei* provém, supostamente, da utilização dos iniciadores utilizados, os quais foram desenhados a partir de seqüências consenso entre diferentes isoformas de CRUS desse camarão.

A grande variedade de isoformas de CRUS encontradas em uma única espécie de crustáceo sugere que os genes codificantes para esse PAM também ocorra em cópias múltiplas pelo genoma de crustáceos (RATTANACHAI et al., 2004). Diferentes isoformas de CRUS foram identificadas nos camarões *L. vannamei* (BARTLETT et al., 2002; VARGAS-ALBORES et al., 2004), *L. setiferus* (BARTLETT et al., 2002), *M. japonicus* (RATTANACHAI et al., 2004), no lagostim *P. leniusculus* (JIRAVANICHPAISAL et al., 2007) e no caranguejo *C. maenas* (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007). Entretanto, em cada espécie nativa de camarão foi identificada somente uma isoforma. Esse fato pode estar relacionado ao uso dos iniciadores utilizados e/ou com o número de colônias selecionadas para seqüenciamento.

A análise filogenética entre diferentes seqüências aminoacídicas mostrou uma separação das CRUS presentes entre na maioria das espécies de camarões peneídeos e as pertencentes às demais espécies de crustáceos. Brockton e colaboradores (2007) sugeriram a presença de um único gene multi-*exon* no caranguejo *C. maenas*. Em contraste, como já mencionado anteriormente, outros autores acreditam que os genes codificantes para CRUS de camarões ocorram em cópias múltiplas pelo genoma (RATTANACHAI et al., 2004).

Com base nessas constatações e também pela a análise das significativas diferenças aminoacídicas encontradas entre as CRUS de camarões e de outros crustáceos pleociematos, sugere-se que durante o processo evolutivo tenha ocorrido a perda da região amino-terminal rica em glicina e que talvez essa molécula tenha sido segregada em apenas um *locus* nas espécies mais recentes (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007). Devido ao fato dos camarões peneídeos serem um dos grupos mais antigos dentro da classe Malacostraca, acredita-se que as CRUS presentes nesses animais sejam os ortólogos precursores das demais CRUS encontradas em outros crustáceos decápodos. Entretanto, estudos a respeito da

composição gênica das CRUS de diferentes crustáceos ainda precisam ser realizados para a confirmação dessas hipóteses.

Em conclusão, neste trabalho foi possível detectar, caracterizar e depositar em bancos públicos (GenBank), seqüências codificadoras para três classes de peptídeos antimicrobianos de peneídeos brasileiros, PEN, ALF e CRUS. Este é o primeiro registro de peptídeos das duas últimas classes em camarões nativos. Em seqüência a este estudo, iniciamos a expressão destes peptídeos em sistema recombinante (primeiramente o ALF) para que suas atividades biológicas sejam determinadas. Este estudo abre perspectivas para uma nova geração de agentes terapêuticos, originados da biodiversidade brasileira, encontrando aplicações potenciais não apenas em aquíicultura, como também em saúde humana e veterinária, no sentido de constituir uma alternativa para o crescente número de microrganismos resistentes à maioria dos antibióticos atualmente utilizados.

## 6. CONCLUSÕES

- Através da técnica de RT-PCR foi possível identificar a presença de três classes de peptídeos antimicrobianos (PAM) nos hemócitos de três espécies de camarões nativos, *Farfantepenaeus paulensis*, *F. subtilis* e *Litopenaeus schmitti*: peneidinas (PEN), crustinas (CRUS) e fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF);
- Em *Farfantepenaeus subtilis* foi amplificado um fragmento de cDNA correspondendo a uma seqüência de PEN. A isoforma identificada pertence ao subgrupo 2 das PEN e foi denominada como *Farsub* PEN2-1 (GenBank: EF450742). Essa seqüência codifica para um peptídeo maduro altamente catiônico composto por 54 aminoácidos e que apresentou alta identidade entre diferentes isoformas de PEN2, principalmente com *F. paulensis* (91-93%) e diferentes espécies de camarões do gênero *Litopenaeus* (65-73%);
- Em *Litopenaeus schmitti*, mas não nos outros peneídeos, foi possível obter um produto de amplificação correspondendo a uma seqüência de ALF que apresenta uma ORF de 369 pb que codifica para um peptídeo maduro com 98 aminoácidos, com similaridades de 93 e 95% com *F. chinensis* e *L. vannamei*, respectivamente, e em torno de 75% com as isoformas ALFPm3-5 de *P. monodon*. *Litsch* ALF (GenBank: DQ991357) apresenta-se como uma molécula altamente catiônica (pI teórico = 10,18) e contém, assim como outras seqüências de ALF, uma região anfipática entre dois resíduos conservados de cisteína;

- Nas três espécies de peneídeos nativos foram obtidas seqüências similares a CRUS, sendo denominadas de *Farsub* CRUS (127 aminoácidos, GenBank: EF450744), *Farpau* CRUS (150 aminoácidos, GenBank: EF182747) e *Litsch* CRUS (148 aminoácidos, GenBank: EF182748). As três seqüências codificam para peptídeos contendo uma região amino-terminal hidrofóbica rica em resíduos de glicina e uma região carboxi-terminal com 12 resíduos conservados de cisteína, onde se encontra um domínio WAP. Todas as seqüências de CRUS apresentaram alta similaridade com as diferentes isoformas de CRUS do camarão *L. vannamei* (em torno de 85%);
  
- As análises filogenéticas realizadas sugerem que as diferentes classes de PAM descritas ocorram em cópias múltiplas pelo genoma de camarões. Sugere-se que as PEN tenham surgido como uma novidade evolutiva no grupo de peneídeos e que os diferentes genes tenham sido originados a partir de duplicação gênica. Entretanto, o ALF e a CRUS parecem ter sido originados em algum grupo ancestral e posteriormente distribuídos entre os diferentes grupos de crustáceos.



## REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AKETAGAWA, J.; MIYATA, T.; OHTSUBO, S.; NAKAMURA, T.; MORITA, T.; HAYASHIDA, H.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y. Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 7357-7365, 1986.

BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALES, M.; de LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 149-168, 2004.

BARRACCO, M.A.; de LORGERIL, J.; GUEGUEN, Y.; BACHÈRE, E. Molecular characterization of penaeidins from two Atlantic Brazilian shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus schmitti*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, p. 117-120, 2005.

BARTLETT, T.C.; CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S.; WARR, G.W. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology NY**, v. 4, p. 278-293, 2002.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, p. 783-795, 2004.

BOMAN, H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, v. 254, p. 197-215, 2003.

BONNICHON, V.; LIGHTNER, D.V.; BONAMI, J.R. Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 72, p. 179-184, 2006.

BROCKTON, V.; HAMMOND, J.A.; SMITH, V.J. Gene characterization, isoforms and recombinant expression of carcinin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 943-949, 2007.

BULET P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 169-184, 2004.

CADORET, J.P.; DEBO, R.; CORNUDELLA, L.; LARDANS, V.; MORVAN, A.; ROCH, P.; BOULO, V. Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. **FEBS Letters**, v. 460, p. 81-85, 1999.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 72-82, 2004.

CHEN, J.Y.; PAN, C.Y.; KUO, C.M. cDNA sequence encoding an 11.5-kDa antibacterial peptide of the shrimp *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 659-664, 2004.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Molecular cloning and sequencing of shrimp (*Penaeus monodon*) penaeidin-5 cDNA. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 665-670, 2004.

CUTHBERTSON, B.J.; BULLESBACH, E.E.; GROSS, P.S. Discovery of synthetic penaeidin activity against antibiotic-resistant fungi. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 68, p. 120-127, 2006.

\_\_\_\_\_; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics**, v. 54, p. 442-445, 2002.

\_\_\_\_\_; YANG, Y.; BACHÈRE, E.; BULLESBACH, E.E.; GROSS, P.S.; AUMELAS, A. Solution structure of synthetic penaeidin-4 with structural and functional comparisons with penaeidin-3. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 16009-16018, 2005.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; VAN DORSSELAER, A.; RODRIGUEZ, J.; BACHÈRE, E. Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 28398-28406, 1997.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, p. 335-346, 1999.

\_\_\_\_\_; MUÑOZ, M.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1260-1271, 2000.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 461-469, 2000.

DESTOUMIEUX-GARZON, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47070-47077, 2001.

DING, J.L.; TAN, K.C.; THANGAMANI, S.; KUSUMA, N.; SEOW, W.K.; BUI, T.H.; WANG, J.; HO, B. Spatial and temporal coordination of expression of immune response genes during *Pseudomonas* infection of horseshoe crab, *Carcinoscorpius rotundicauda*. **Genes and Immunity**, v. 6, p. 557-574, 2005.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Based-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FOGAÇA, A.C.; SILVA, P.I. Jr; MIRANDA, M.T.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 25330-25334, 1999.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3784-3788, 2003.

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

GUEGUEN, Y.; GARNIER, J.; ROBERT, L.; LEFRANC, M.P.; MOUGENOT, I.S.; de LORGERIL, J.; JANECH, M.; GROSS, P.S.; WARR, G.W.; CUTHBERTSON, B.J.; BARRACCO, M.A.; BULET, P.; AUMELAS, A.; YANG, Y.; BO, D.; XIANG, J.; TASSANAKAJON, A.; PIQUEMAL, D.; BACHÈRE, E. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 283-288, 2006.

HAGIWARA, K.; KIKUCHI, T.; ENDO, Y.; USUI, K.; TAKAHASHI, M.; SHIBATA, N.; KUSAKABE, T.; XIN, H.; HOSHI, S.; MIKI, M.; INOOKA, N.; TOKUE, Y.; NUKIWA, T. Mouse SWAM1 and SWAM2 are antibacterial proteins composed of a single whey acidic protein motif. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 1973-1979, 2003.

HAUTON, C.; BROCKTON, V.; SMITH, V.J. Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 1490-1496, 2006.

HERBINIÈRE, J.; BRAQUART-VARNIER, C.; GRÈVE, P.; STRUB, J.M.; FRÈRE, J.; DORSSELAER, A.V.; MARTIN, G. Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 489-499, 2005.

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

HOFFMANN, J.A.; REICHART, J.M.; HETRU, C. Innate immunity in higher insects. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 8-13, 1996.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p. 868-877, 1999.

IWANAGA, S. The limulus clotting reaction. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, p. 74-82, 1993.

\_\_\_\_\_; KAWABATA, S. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. **Frontiers in bioscience**, v. 3, p. 973-984, 1998.

JIANG H.; KANOST, M.R. Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 1082-1087, 1997.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, S.Y.; KIM, Y.A.; ANDREN, T.; SÖDERHÄLL, I. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, p. 441-455, 2007.

KANG, C.J.; WANG, J.X.; ZHAO, X.F.; YANG, X.M.; SHAO, H.L.; XIANG, J.H. Molecular cloning and expression analysis of *Ch*-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 513-525, 2004.

\_\_\_\_\_; XUE, J.F.; LIU, N.; ZHAO, X.F.; WANG, J.X. Characterization and expression of a new subfamily member of Penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 1546-1554, 2007.

KAWANO, K.; YONEYA, T.; MIYATA, T.; YOSHIKAWA, K.; TOKUNAGA, F.; TERADA, Y.; IWANAGA, S. Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). NMR determination of the beta-sheet structure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 15365-15367, 1990.

KHOO, L.; ROBINETTE, D.W.; NOGA, E.J. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. **Marine Biotechnology**, v. 1, p. 44-51, 1999.

KIM, H.S.; PARK, C.B.; KIM, M.S.; KIM, S.C. cDNA cloning and characterization of buforin I, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 229, p. 381-387, 1996.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

LEE, S.Y.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 7927-7933, 2003.

LI, L.; WANG, J.X.; ZHAO, X.F.; KANG, C.J.; LIU, N.; XIANG, J.H.; LI, F.H.; SUEDA, S.; KONDO, H. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, *Ch*-penaeidin, in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 39, p. 144-151, 2005.

LIU, F.; LIU, Y.; LI, F.; DONG, B.; XIANG, J. Molecular cloning and expression profile of putative antilipoplysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Marine Biotechnology NY**, v. 7, p. 600-608, 2005.

LIU, H.; JIRAVANICHPAISAL, P.; SÖDERHÄLL, I.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Antilipoplysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Virology**, v. 80, p. 10365-10371, 2006.

LORENZINI, D.M.; FUKUZAWA, A.H.; SILVA, P.I. Jr; MACHADO-SANTELLI, G.; BIJOVSKY, A.T.; DAFFRE, S. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 1011-1016, 2003.

\_\_\_\_\_; SILVA, P.I. Jr; FOGAÇA, A.C.; BULET, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 781-791, 2003.

MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; NOEL, T.; ROMESTAND, B.; BEAUVILLAIN, J.C.; SALZET, M.; ROCH, P. Differential distribution and defense involvement of antimicrobial peptides in mussel. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 2759-2769, 2000.

MORITA, T.; OHTSUBO, S.; NAKAMURA, T.; TANAKA, S.; IWANAGA, S.; OHASHI, K.; NIWA, M. Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). **Journal of Biochemistry**, v. 97, p. 1611-1620, 1985.

MUÑOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; GARNIER, J.; GUEGUEN, Y.; BULET, P.; SAULNIER, D.; BACHÈRE, E. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 961-972, 2004.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; SAULNIER, D.; BACHÈRE, E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimps. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 2678-2689, 2002.

MUTA, T.; MIYATA, T.; TOKUNAGA, F.; NAKAMURA, T.; IWANAGA, S. Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. **Journal of Biochemistry**, v. 101, p. 1321-1330, 1987.

NAGOSHI, H.; INAGAWA, H.; MORII, K.; HARADA, H.; KOHCHI, C.; NISHIZAWA, T.; TANIGUCHI, Y.; UENOBE, M.; HONDA, T.; KONDOH, M.; TAKAHASHI, Y.; SOMA, G. Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. **Molecular immunology**, v. 43, p. 2061-2069, 2006.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 215-235, 2000.

NOTHWEHR, S.F.; GORDON, J.I. Targeting of proteins into the eukaryotic secretory pathway: signal peptide structure/function relationships. **BioEssays**, v. 12, p. 479-484, 1990.

O'LEARY, N.A.; GROSS, P.S. Genomic structure and transcriptional regulation of the penaeidin gene family from *Litopenaeus vannamei*. **Gene**, v. 371, p. 75-83, 2006.

POLANOWSKI, A.; BLUM, M.S.; WHITMAN, D.W.; TRAVIS, J. Proteinase inhibitors in the nonvenomous defensive secretion of grasshoppers: antiproteolytic range and possible significance. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 117, p. 525-529, 1997.

RANGANATHAN, S.; SIMPSON, K.J.; SHAW, D.C.; NICHOLAS, K.R. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 17, p. 106-113, 1999.

RATTANACHAI, A.; HIRONO, I.; OHIRA, T.; TAKAHASHI, Y.; AOKI, T. Cloning of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide cDNA and analysis of its expression. **Fisheries Science**, v. 70, p. 765-771, 2004.

REDDY, K.V.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v, 24, p. 536-547, 2004.

RELF, J.M.; CHISHOLM, J.R.; KEMP, G.D.; SMITH, V.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, p. 350-357, 1999.

RIED, C.; WAHL, C.; MIETHKE, T.; WELLNHOFER, G.; LANDGRAF, C.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; HOESS, A. High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 28120-28127, 1996.

ROJTINNAKORN, J.; HIRONO, I.; ITAMI, T.; TAKAHASHI, Y.; AOKI, T. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 13, p. 69-83, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. (Eds) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. vol 1-3.

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 shore crab, *Carcinus maenas*. **European Journal of Biochemistry**, v. 240, p. 532-539, 1996.

SHIGENAGA, T.; MUTA, T.; TOH, Y.; TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S. Antimicrobial tachyplesin peptide precursor: cDNA cloning and cellular localization in the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 21350-21354, 1990.

SILVA, P.I. Jr; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 33464-33470, 2000.

SOMBOONWIWAT, K.; MARCOS, M.; TASSANAKAJON, A.; KLINBUNGA, S.; AUMELAS, A.; ROMESTAND, B.; GUEGUEN, Y.; BOZE, H.; MOULIN, G.; BACHÈRE, E. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 841-851, 2005.

\_\_\_\_\_; SUPUNGUL, P.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; AOKI, T.; HIRONO, I.; TASSANAKAJON, A. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 26-36, 2006.

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

STOSS, T.D.; NICKELL, M.D.; HARDIN, D.; DERBY, C.D.; MCCLINTOCK, T.S. Inducible transcript expressed by reactive epithelial cells at sites of olfactory sensory neuron proliferation. **Journal of Neurobiology**, v. 58, p. 355-368, 2004.

SUPUNGUL, P.; KLINBUNGA, S.; PICHYANGKURA, R.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 61, p. 123-135, 2004.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; JITRAPAKDEE, S.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 487-494, 2002.

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

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TINCU, J.A.; TAYLOR, S.W. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 3645-3654, 2004.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, 717-735, 2005.

TZOU, P.; OHERSSER, S.; FERRANDON, D.; CAPOVILLA, M.; REICHHART, J.M.; LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J.A.; IMLER, J.L. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. **Immunity**, v. 13, p. 737-748, 2000.

URBAN, M.; ROZENTAL, R.; SPRAY, D.C. A simple RT-PCR-based strategy for screening connexin identity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1029-1037, 1999.

VARGAS-ALBORES, F.; YEPIZ-PLASCENCIA, G.; JIMENEZ-VEGA, F.; AVILA-VILLA, A. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 138, p. 415-422, 2004.



WANG, D.N.; LIU, J.W.; YANG, G.Z.; ZHANG, W.J.; WU, X.F. Cloning of anti-LPS factor cDNA from *Tachypleus tridentatus*, expression in *Bombyx mori* larvae and its biological activity in vitro. **Molecular Immunology**, v. 21, p. 1-7, 2002.

WANG, K.J.; HUANG, W.S.; YANG, M.; CHEN, H.Y.; BO, J.; LI, S.J.; WANG, G.Z. A male-specific expression gene, encodes a novel anionic antimicrobial peptide, scygonadin, in *Scylla serrata*. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 1971-1978, 2007.

YANG, Y.; PONCET, J.; GARNIER, J.; ZATYLYNY, C.; BACHÈRE, E.; AUMELAS, A. Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 36859-36867, 2003.

ZHANG, J.; LI, F.; WANG, Z.; XIANG, J. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 605-614, 2007.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

### Listagem dos diferentes subgrupos de peneidinas (PEN) com seus respectivos números de acesso no GenBank

Espécie	Peneidina	n° acesso GenBank	Referência
<b><i>Peneidina2 (PEN2)</i></b>			
<i>F. subtilis</i>	<b>Farsub PEN2-1</b>	<b>EF450742</b>	<b>presente estudo</b>
<i>F. paulensis</i>	<i>Farpau</i> PEN2-1	AY956416	Barracco et al., 2005
	<i>Farpau</i> PEN2-2	AY956417	Barracco et al., 2005
<i>L. schmitti</i>	<i>Litsch</i> PEN2-1	AY956418	Barracco et al., 2005
	<i>Litsch</i> PEN2-2	AY956419	Barracco et al., 2005
<i>L. vannamei</i>	<i>Litvan</i> PEN2-1	Y14925	Destoumieux et al., 1997
	<i>Litvan</i> PEN2-2	P81056	Destoumieux et al., 1997
	<i>Litvan</i> PEN2-3	AF390146	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN2-4	DQ211699	O'Leary; Gross, 2006
<i>L. stylirostris</i>	<i>Litsy</i> PEN2-1	AY351655	Muñoz et al., 2004
<i>L. setiferus</i>	<i>Litset</i> PEN2-1	AY039205	Cuthbertson et al., 2002
<i>M. japonicus</i>	<i>EST sequences</i>	EST database NCBI	Rojtinnakorn et al., 2002
<b><i>Peneidina3 (PEN3)</i></b>			
<i>L. vannamei</i>	<i>Litvan</i> PEN3-1	Y14926	Destoumieux et al., 1997
	<i>Litvan</i> PEN3-2	Y14927	Destoumieux et al., 1997
	<i>Litvan</i> PEN3-3	Y14928	Destoumieux et al., 1997
	<i>Litvan</i> PEN3-4	AF390145	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN3-5	AF390141	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN3-6	AF387660	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN3-7	AF390142	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN3-8	AF390140	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN3-9	AF390143	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN3-10	AF390144	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN3-11	DQ211700	O'Leary; Gross, 2006
<i>L. stylirostris</i>	<i>Litsy</i> PEN3-1	AY351656	Muñoz et al., 2004
	<i>Litsy</i> PEN3-2	DQ010422	Muñoz et al., 2004
<i>L. setiferus</i>	<i>Litset</i> PEN3-1	AY039206	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litset</i> PEN3-2	AY039204	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litset</i> PEN3-3	AY039202	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litset</i> PEN3-4	AY039203	Cuthbertson et al., 2002
<i>P. semisulcatus</i>	<i>Pensem</i> PEN3-1	----	Gueguen et al., 2006
<i>P. monodon</i>	<i>Penmon</i> PEN3-1	BI784459	Supungul et al., 2002
	<i>Penmon</i> PEN3-2	BI018089	Supungul et al., 2002
	<i>Penmon</i> PEN3-3	BI784441	Supungul et al., 2002
<i>F. chinensis</i>	<i>Fenchi</i> PEN3-1	AY260151	Kang et al., 2004
	<i>Fenchi</i> PEN3-2	DQ308408	----
<b><i>Peneidina4 (PEN4)</i></b>			
<i>L. schmitti</i>	<i>Litsch</i> PEN4-1	AY956420	Barracco et al., 2005
<i>L. vannamei</i>	<i>Litvan</i> PEN4-1	AF390147	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN4-2	AF390149	Cuthbertson et al., 2002
	<i>Litvan</i> PEN4-3	DQ211701	O'Leary; Gross, 2006
<i>L. setiferus</i>	<i>Litset</i> PEN4-1	AY039207	Cuthbertson et al., 2002
<b><i>Peneidina5 (PEN5)</i></b>			
<i>P. monodon</i>	<i>Penmon</i> PEN5-1	AY326471	Chen et al., 2004b
<i>F. chinensis</i>	<i>Fenchi</i> PEN5-1	DQ153253	Kang et al., 2007
	<i>Fenchi</i> PEN5-2	AY669323	Kang et al., 2007
	<i>Fenchi</i> PEN5-3	DQ308407	----

## APÊNDICE B

### Listagem dos diferentes tipos fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF) com seus respectivos número de acesso no GenBank

Espécie	ALF	n° acesso GenBank	Referência
<b>Crustáceos</b>			
<i>L. schmitti</i>	<i>Litsch</i> ALF	<b>DQ991357</b>	<b>presente estudo</b>
<i>P. monodon</i>	ALFPm1	BI784449	Supungul et al., 2004
	ALFPm2	BI784448	Supungul et al., 2004
	ALFPm3a	BI784450	Supungul et al., 2002
	ALFPm3b	----	Somboonwivat et al., 2006
	ALFPm3c	----	Somboonwivat et al., 2006
	ALFPm3d	----	Somboonwivat et al., 2006
	ALFPm4	BI784451	Supungul et al., 2004
	ALFPm5	CF415871	Supungul et al., 2004
	<i>L. vannamei</i>	ALF gi078 VV-R	DQ208701
ALF gi139 AV-R		DQ208702	----
ALF gi240 AA-K		DQ208703	----
ALF gi332 AA-K		DQ208704	----
ALF gi322 AA-K		DQ208705	----
ALF gi518 VV-R		DQ208706	----
<i>L. stylirostris</i>	<i>L. stylirostris</i> ALF	DQ010421	----
<i>L. setiferus</i>	<i>EST sequences</i>	EST database NCBI	Gross et al., 2001
<i>M. japonicus</i>	M-ALF	AB210110	Nagoshi et al., 2006
<i>F. chinensis</i>	ALFFc	AY859500	Liu et al., 2005
<i>P. leniusculus</i>	<i>EST sequences</i>	EST database NCBI	Liu et al., 2006
<i>C. maenas</i>	<i>EST sequences</i>	EST database NCBI	----
<i>C. sapidus</i>	<i>EST sequences</i>	EST database NCBI	----
<i>H. americanus</i>	<i>EST sequences</i>	EST database NCBI	----
<b>Quelicerados</b>			
<i>T. tridentatus</i>	TALF	P07087	Aketagawa et al., 1986
	TALF	AF227150	Wang et al., 2002
<i>L. polyphemus</i>	LALF	1307201A	Muta et al., 1987
	LALF	P07086	Muta et al., 1987
<i>C. rotundicauda</i>	<i>EST sequences</i>	EST database NCBI	Ding et al., 2005

## APÊNDICE C

### Listagem dos diferentes tipos crustinas (CRUS) com seus respectivos número de acesso no GenBank

Espécie	Crustina	n° acesso GenBank	Referência
<i>F. subtilis</i>	<b>Farsub CRUS</b>	<b>EF450744</b>	<b>presente estudo</b>
<i>F. paulensis</i>	<b>Farpau CRUS</b>	<b>EF182747</b>	<b>presente estudo</b>
<i>L. schmitti</i>	<b>Litsch CRUS</b>	<b>EF182748</b>	<b>presente estudo</b>
<i>L. vannamei</i>	crustin Lv1	AF430071	Bartlett et al., 2002
	crustin Lv2	AF430072	Bartlett et al., 2002
	crustin Lv3	AF430073	Bartlett et al., 2002
	crustin Lv4	AF430074	Bartlett et al., 2002
	crustin Lv5	AF430075	Bartlett et al., 2002
	crustin Lv6	AF430076	Bartlett et al., 2002
	crustin I PvH059	AY488492	Vargas-Albores et al., 2004
	crustin I PvH067	AY488493	Vargas-Albores et al., 2004
	crustin P PvH082	AY488494	Vargas-Albores et al., 2004
	crustin P PvH114	AY488495	Vargas-Albores et al., 2004
	crustin P PvH116	AY488496	Vargas-Albores et al., 2004
	crustin P PvH117	AY488497	Vargas-Albores et al., 2004
	crustin <i>L. vannamei</i>	AY486426	----
	<i>L. setiferus</i>	crustin Ls1	AF430077
crustin Ls2		AF430078	Bartlett et al., 2002
crustin Ls3		AF430079	Bartlett et al., 2002
<i>P. monodon</i>	crusPm1	CD766060	Supungul et al., 2004
	crusPm2	BI784444	Supungul et al., 2004
	crusPm3	BI784445	Supungul et al., 2004
	crusPm4	CF415873	Supungul et al., 2004
<i>M. japonicus</i>	crustin-like peptide type1	AB121740	Rattanachai et al., 2004
	crustin-like peptide type2	AB121741	Rattanachai et al., 2004
	crustin-like peptide type3	AB121742	Rattanachai et al., 2004
	crustin-like peptide type4	AB121743	Rattanachai et al., 2004
	crustin-like peptide type5	AB121744	Rattanachai et al., 2004
<i>F. chinensis</i>	CruFc	DQ097703	Zhang et al., 2007
	CshFc	DQ097704	Zhang et al., 2007
	crustin-like <i>F. chinensis</i>	AY871268	----
<i>P. leniusculus</i>	Plcrustin1	EST database NCBI	Jiravanichpaisal et al, 2007
	Plcrustin2	EST database NCBI	Jiravanichpaisal et al., 2007
	Plcrustin3	EST database NCBI	Jiravanichpaisal et al., 2007
<i>C. maenas</i>	carcinin1	AJ237947	Brockton et al., 2007
	carcinin2	AJ427538	Brockton et al., 2007
	carcinin3	AJ821886	Brockton et al., 2007
	carcinin4	AJ821887	Brockton et al., 2007
	carcinin5	AJ821888	Brockton et al., 2007
	carcinin6	AJ821889	Brockton et al., 2007
<i>H. gammarus</i>	<i>H. gammarus</i> crustin-like	AJ786653	Hauton et al., 2006
<i>P. argus</i>	PET15	AY340636	Stoss et al., 2004
<i>C. sapidus</i>	<i>EST sequences</i>	EST database NCBI	----
<i>C. pugilator</i>	<i>EST sequences</i>	EST database NCBI	----